

**FRACTION ACIDO-SOLUBLE ET INSOLUBLE  
DU COLLAGÈNE DE LA PAROI VEINEUSE (bovine).  
CARACTÉRISATIONS BIOCHIMIQUES  
ET GÉNÉTIQUES.**

**Etude préliminaire du collagène de veines  
variqueuses humaines.**

**THÈSE**

présentée à la Faculté des Sciences  
de l'Université de Genève  
pour obtenir le grade de docteur ès sciences biochimiques

par

**Marie-Antoinette BIANCO**  
de  
Conthey-Bourg (VS)

Thèse No 1929



**FRACTION ACIDO-SOLUBLE ET INSOLUBLE  
DU COLLAGÈNE DE LA PAROI VEINEUSE (bovine).  
CARACTÉRISATIONS BIOCHIMIQUES  
ET GÉNÉTIQUES.**

**Etude préliminaire du collagène de veines  
variqueuses humaines.**

**THÈSE**

présentée à la Faculté des Sciences  
de l'Université de Genève  
pour obtenir le grade de docteur ès sciences biochimiques

par

**Marie-Antoinette BIANCO**

de

Conthey-Bourg (VS)

Thèse No 1929

La faculté des sciences, sur le préavis de Messieurs J-P. BARGETZI, professeur ordinaire et directeur de thèse, E. STEIN, professeur ordinaire et D. HERBAGE, professeur (Université Claude-Bernard, Lyon-Villeurbanne) autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

GENEVE, le 21 août 1979

Le Doyen:

B. LEVRAT

Thèse No 1929



A mes parents



## ABREVIATIONS

|       |                                    |
|-------|------------------------------------|
| DEAE  | : diéthyle amino-éthyle            |
| CM    | : carboxy méthyle                  |
| SDS   | : sodium dodécyle sulfate          |
| PCA   | : acide pyrocaboxyllique           |
| TLC   | : chromatographie sur couche mince |
| TEMED | : 1,2-bis(diméthyle amino) éthane  |
| CNBr  | : bromure de cyanogène             |
| DTT   | : dithiothréitol                   |
| SLS   | : segment long spacing             |
| ATP   | : adénosine-5'triphosphate         |



## TABLE DES MATIERES.

|                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------|----|
| I. INTRODUCTION.....                                                 | 1  |
| II. COLLAGENE DE VEINES SAPHENES SUPERIEURES DE VEAU.....            | 14 |
| A. COLLAGENE SOLUBLE SANS UTILISATION DE PEPSINE.....                | 14 |
| 1. Préparation de collagène soluble à partir de veines saphènes..... | 14 |
| de veau.....                                                         | 14 |
| 2. Homogénéité.....                                                  | 19 |
| 3. Caractérisation du collagène soluble.....                         | 21 |
| 3.1. Composition en acides aminés.....                               | 21 |
| 3.2. Séparation des chaînes.....                                     | 24 |
| 3.3. Détermination du poids moléculaire.....                         | 30 |
| 3.4. Dosage des sucres à l'anthrone.....                             | 31 |
| 3.5. Peptides au CNBr de la chaîne 1 du collagène.....               | 32 |
| 4. Conclusions.....                                                  | 45 |
| B. COLLAGENE SOLUBILISE A L'AIDE DE LA PEPSINE.....                  | 46 |
| 1. Solubilisation du collagène de veines saphènes à l'aide           |    |
| de la pepsine.....                                                   | 46 |
| 1.1. Introduction.....                                               | 46 |
| 1.2. Matériel et méthodes.....                                       | 46 |
| 1.3. Résultats et discussion.....                                    | 47 |
| 2. Précipitation fractionnée du collagène extrait par la pepsine.    |    |
| Quelques caractérisations de ces fractions.....                      | 48 |
| 2.1. Introduction.....                                               | 48 |
| 2.2. Matériel et méthodes.....                                       | 48 |
| 2.3. Résultats et discussion.....                                    | 52 |
| 2.3.1. Rendement des différents précipités.....                      | 52 |
| 2.3.2. Analyse des acides aminés.....                                | 53 |
| 2.3.3. Gels de polyacrylamide 6 % en présence de SDS.....            | 53 |
| 2.3.4. Peptides CNBr des différentes fractions.....                  | 56 |
| 2.3.5. Electrophorèse interrompue sur gel à 6 %.....                 | 58 |
| 3. Conclusions.....                                                  | 59 |
| C. RENDEMENT GLOBAL DE L'EXTRACTION ET % DES DIFFERENTS TYPES        |    |
| DE COLLAGENES DANS LA VEINE SAPHENE DE VEAU.....                     | 62 |
| III. COLLAGENE DE VEINES SAPHENES VARIQUEUSES HUMAINES.              |    |
| PRELIMINAIRES.....                                                   | 64 |
| A. COLLAGENE SOLUBLE SANS DIGESTION PAR LA PEPSINE.....              | 64 |
| 1. Préparation du collagène soluble.....                             | 64 |
| 2. Quelques caractérisations du collagène soluble de veines          |    |
| variqueuses.....                                                     | 65 |
| 3. Conclusions.....                                                  | 69 |
| B. COLLAGENE SOLUBILISE A L'AIDE DE LA PEPSINE.....                  | 71 |
| 1. Précipitation fractionnée du collagène de veines variqueuses      |    |
| extrait par la pepsine.....                                          | 71 |

|                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.1. Matériel et méthodes.....                                                                | 71 |
| 1.2. Résultats et discussion.....                                                             | 71 |
| 1.2.1. Rendement de la précipitation fractionnée.....                                         | 71 |
| 1.2.2. Analyse des acides aminés.....                                                         | 72 |
| 1.2.3. Séparation sur gels de polyacrylamide 6 % , en présence de SDS.....                    | 72 |
| 1.2.4. Electrophorèse interrompue sur gel de polyacrylamide..                                 | 75 |
| 1.2.5. Peptides CNBr des différentes fractions pepsiques provenant des veines variqueuses.... | 76 |
| 1.3. Conclusions.....                                                                         | 78 |

|                               |    |
|-------------------------------|----|
| IV CONCLUSIONS GENERALES..... | 79 |
|-------------------------------|----|

|                       |    |
|-----------------------|----|
| V. BIBLIOGRAPHIE..... | 81 |
|-----------------------|----|

## I. INTRODUCTION .

Le collagène est le principal composant du tissu conjonctif , la protéine de structure la plus abondante chez les animaux. Elle représente le 50 % des protéines du corps humain , et à elle seule , constitue le 80 % du poids sec de la peau. Sa large distribution dans de nombreux tissus , aussi bien chez les vertébrés que chez les invertébrés , explique pourquoi de nombreuses études lui ont déjà été consacrées. En ce qui concerne le collagène de vaisseaux sanguins, beaucoup de travaux ont déjà été entrepris sur l'artère et l'aorte , mais aucune étude biochimique n'a encore été faite sur le collagène de veine.

Le collagène étant un des constituants majeurs de la paroi veineuse , il me semble utile d'exposer d'abord sa structure histologique et ses différentes fonctions.

### Histologie des vaisseaux sanguins.

Les vaisseaux sanguins sont constitués par des couches histologiques , qui sont , dans l'ordre :

- 1) Une tunique interne , l'intima , constituée par
  - une couche de cellules endothéliales tapissant l'intérieur du vaisseau
  - une couche subendothéliale , composée de tissu conjonctif lâche
  - une membrane limitante interne élastique.
- 2) Une tunique médiane , la média , constituée principalement de cellules musculaires lisses , entourées de quantités variables de tissu fibrillaire , sous la forme de laminas ou de fibres circulaires et transverses . Les laminas sont habituellement munies de fenestrae ( trous ) à travers lesquels des substances peuvent diffuser et nourrir les cellules profondes de la paroi vasculaire.
- 3) L'adventice , constituée de tissu conjonctif avec une grande quantité de fibroblastes et de fibres conjonctives . L'adventice fusionne plus ou moins avec le tissu conjonctif qui enveloppe les organes voisins , unissant ainsi partiellement les vaisseaux aux organes. On trouve souvent une enveloppe élastique externe appelée membrane limitante externe

Les principales différences entre les artères et les veines du point de vue histologique sont les suivantes :

- Les parois des artères sont plus épaisses que celles des veines.

- Les artères ont une intima et une media beaucoup plus développées que la veine.
- Dans les veines, l'adventice est nettement prédominante. La tunique interne possède habituellement une mince couche de cellules subendothéliales, mais cette couche est parfois absente. La media consiste principalement en cellules musculaires, entourées de fibres de collagène et d'un réseau de fibres élastiques. L'adventice, couche la plus épaisse, contient des cellules musculaires lisses et des fibroblastes, et une grande quantité de collagène.

Schéma général d'un vaisseau sanguin.

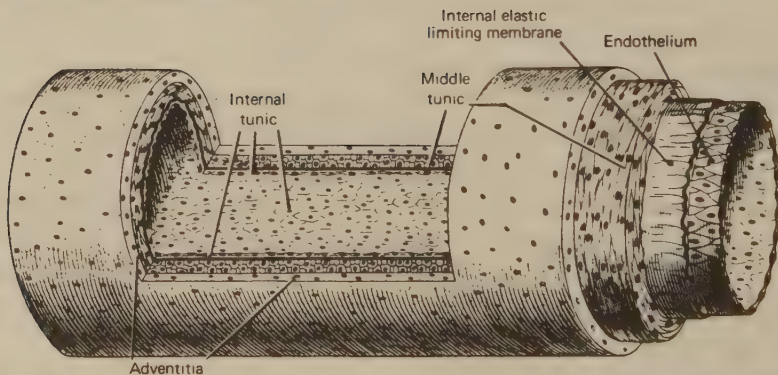
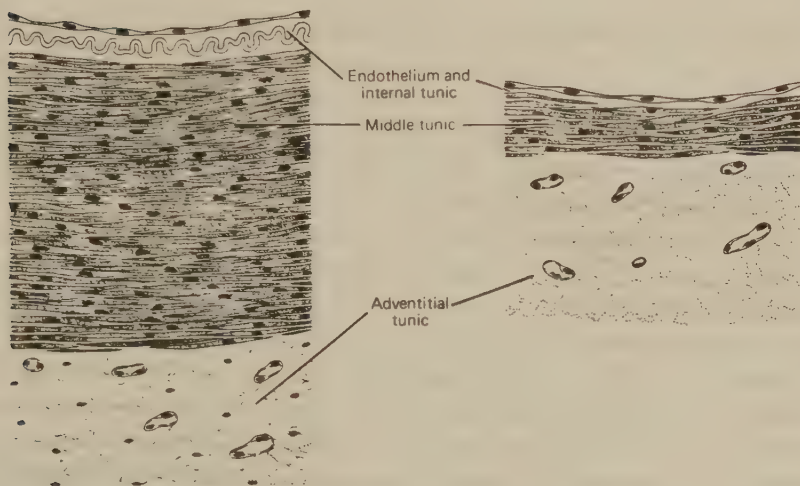


Diagramme comparant la structure d'une artère ( à gauche ) et , d'une veinule.



Dans le tissu conjonctif vasculaire , comme dans la plupart des tissus conjonctifs , le collagène est généralement associé à l'élastine et aux protéoglycans. Les protéoglycans forment la substance amorphe. Ils sont constitués d'une partie protéique et d'une partie polysaccharidique. Cette dernière est composée principalement d'unités disaccharidiques répétitives formées d'acides uroniques et de glucosamine ou de galactosamine. Ces mucopolysaccharides sont des polyanions , à cause de leur teneur élevée en acides uroniques , et sont capables de se combiner à un grand nombre de cations , le sodium et le calcium en particulier. Ils jouent un rôle important dans la régulation du contenu en eau des tissus , chaque molécule de protéoglycans étant extrêmement hydrophile. Les interactions entre les fibres de collagène et ces protéoglycans sont encore mal connues. Les liaisons entre ces deux types de molécules sont généralement de nature électrostatique , mais l'existence de liaisons de type covalent n'est pas à exclure. Les protéoglycans présents dans la veine sont les suivants :

dermatane-sulfate ( acide L- iduronique + N- acétyl- D- galactosamine- 6S )

Chondroïtine sulfate ( acide - D- glucoronique , + N- acétyl- D- galactosamine 4 et 6 S )

acide hyaluronique ( acide D- glucoronique + N- acétyl - D - glucosamine )

### Fonctions essentielles de la paroi veineuse.

Parmi les fonctions essentielles assumées par la paroi veineuse , on peut citer :

- le maintien de l'élasticité , qui assure une pression suffisante sur la circulation sanguine afférente.
- le contrôle de la perméabilité ( passage d'ions , de certaines protéines du plasma , et de certaines cellules du sang )
- un rôle de contrôle des échanges osmotiques et des échanges d'eau.

Il y a deux forces en présence agissant sur l'eau au niveau des capillaires :

1) la pression hydrostatique , conséquence de l'action de pompage du coeur , qui force les liquides diffusibles à passer à travers les parois.

2) la pression osmotique propre du plasma sanguin , qui tend à rétablir un équilibre de répartition de l'eau. La pression osmotique est due principalement aux protéines du plasma , car les ions et cristalloïdes passent librement à travers la paroi vasculaire et ont une concentration à peu près équivalente à l'intérieur et à l'extérieur. Au niveau systémique , l'eau a plutôt tendance à passer dans les tissus environnants , car la pression hydrostatique est plus grande que la pression osmotique. Cette pression hydrostatique décroît tout au long du capillaire et , vers l'extrémité veineuse , la pression osmotique prend priorité et il y a un retour d'eau vers la veine. Toute l'eau qui a été expulsée par la force hydrostatique n'est pas restituée intégralement à la veine grâce à la pression osmotique , mais les vaisseaux lymphatiques jouent aussi un rôle dans ces échanges hydriques.

Tous les constituants de la paroi veineuse sont impliqués dans le maintien des propriétés d'élasticité et de perméabilité . On comprend donc aisément que toute modification dans les proportions des constituants macromoléculaires et leurs interactions puisse provoquer des altérations pathologiques. Dans la varicosité par exemple , on a constaté des altérations de la perméabilité , une perte d'élasticité , des échanges osmotiques perturbés . Des déficiences histologiques ont également été observées au microscope électronique : une désorganisation fibrillaire et des défauts dans la fixation des fibres terminales aux éléments cellulaires.

## Diversité biologique des protéines collagéniques.

Pendant de nombreuses années , les recherches effectuées sur le collagène extrait d'une grande variété de tissus tels que peau , os , tendon , ont renforcé l'idée que tous les collagènes de vertébrés faisaient partie d'une seule classe de molécules natives , appelées " tropocollagènes ". Chaque molécule de tropocollagène est constituée par deux chaînes  $\alpha_1$  et une chaîne  $\alpha_2$  , avec des variations de longueur et de séquence minimales , selon leurs appartenances histologiques et les espèces. Mais cette représentation du collagène en tant que molécule unique a été fortement ébranlée par la découverte du collagène de cartilage , qui ne contient qu'un type de chaîne. (49,78,9) Depuis lors , l'hétérogénéité des collagènes a été largement démontrée. Le type III , d'abord identifié à partir de peptides CNBr de collagène insoluble de peau de nouveau-né ( 52 ) est constitué lui aussi par un seul type de chaîne. Il a ensuite été isolé à partir de différents tissus tels que peau , aorte , paroi utérine , après digestion limitée à la pepsine (8,9,20) D'autre part , les membranes basales, y compris celles des parois capillaires , comprennent une autre molécule collagénique , constituée par trois chaînes identiques dénommées  $\alpha_1$ (IV) . Le collagène de membrane basale doit sa découverte à Kefalides (40 ) . De part sa composition en acides aminés et sa teneur élevée en hydrates de carbone , c'est celui qui diffère le plus des autres. Son existence d'entité moléculaire différente des autres collagènes a donné lieu à de nombreuses controverses. Ainsi , d'autres auteurs ont trouvé un mélange hétérogène de composants collagéniques dans des produits dérivés de la digestion pepsique de membranes basales glomérulaires. ( 12 ). Une pareille hétérogénéité de la membrane basale a été démontrée aussi par Sato et Spiro ( 68 ) , sans utilisation de protéases.

Très récemment , deux nouvelles chaînes présentant des caractéristiques collagéniques , ont été isolées à partir de nombreux tissus , et dénommées A et B. Comme exemple de tissus contenant ces nouvelles chaînes , on peut citer : les membranes fœtales humaines , et les tendons d'embryons de poulet lathyriques. (6,36) Des investigations sur les caractéristiques physico-chimiques et l'organisation moléculaire de ces chaînes A et B ont été faites par Rhodes et Miller ( 64 ) . Ces auteurs ont ainsi pu établir que ces chaînes A et B existaient sous deux espèces moléculaires distinctes ayant la composition (A)<sub>3</sub> et (B)<sub>3</sub> . Ces deux nouveaux types de collagène ont un spectre de distribution assez large dans une grande variété de tissus. ( 10 ) . Leur rôle biologique n'est pas encore connu.

La répartition tissulaire des différents types de collagènes actuellement répertoriés est donnée à la table 1. Les différences observées entre les types

sont d'origine génétique et dérivent d'une particulière adaptabilité du ( ou des ) gènes ancestraux au cours de l'évolution phylogénique. Il faut noter que le collagène est la protéine de structure la plus ancienne qui soit : certaines éponges ont déjà des structures fibrillaires , faites d'un collagène primitif.

TABLE 1.

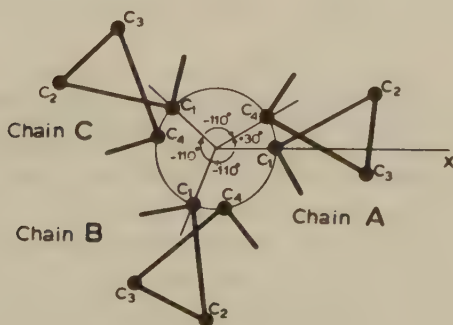
| TYPES DE<br>COLLAGENE | COMPOSITION<br>DE CHAINES | DISTRIBUTION DANS LES TISSUS.                                                                                                                                                          |
|-----------------------|---------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| I                     | $(\alpha_1(I))_2$ 2       | tendons , os , peau , vaisseaux sanguins, dentine.                                                                                                                                     |
| II                    | $\alpha_1(II)_3$          | cartilage hyalin , cellules de rétine , neurale en culture.                                                                                                                            |
| III                   | $\alpha_1(III)_3$         | peau , vaisseaux sanguins, utérus, système gastrointestinal.                                                                                                                           |
| IV                    | $\alpha_1(IV)_3$          | quelques membranes basales.                                                                                                                                                            |
| V et VI               | $(A)_3$ et $(B)_3$        | membranes foetales ( 6 ) , media de l'aorte (10) , foie (10) , tendons d'embryons de poulets lathyriques (36) , membranes synoviales , gencives (5) , placenta , os , cartilage ( 64 ) |
| ?                     | $\alpha_1(I)_3$           | tendons et calvaria de poulets embryonnaires (37) , muscle.                                                                                                                            |

## Structure générale du collagène.

Les molécules de collagène de types génétiques différents, présentent cependant des structures assez semblables. La molécule type a une forme cylindrique d'environ  $3000 \times 15 \text{ \AA}$ . Elle consiste en trois chaînes polypeptidiques homologues nommées  $\alpha$ , enroulées autour d'un axe commun pour former une triple hélice, appelée "hélice-collagène" par Ramachandran (59). Chaque chaîne individuelle contient environ 1050 résidus d'acides aminés, et mis à part les "télopeptides" C et N-terminaux, la glycine apparaît à toutes les trois positions le long de la séquence de la molécule. Une chaîne peut donc être considérée, comme une suite de triplets répétitifs représentés par  $(Y-Y-Gly)_{333}$ . Les positions X et Y peuvent être occupées par un grand nombre d'acides aminés, mais le plus souvent, la position X est un résidu Pro et Y un résidu Hyp. Pro + Hyp forment déjà le 25 % du total des acides aminés. Ce haut contenu en iminoacides et la distribution des résidus Gly sont deux caractères nécessaires pour la formation de la triple hélice.

Chaque chaîne est en elle-même une hélice, avec 3.3 résidus par tour, et un pas de  $9.5 \text{ \AA}$ . Et, dans ces hélices individuelles, les résidus Gly sont arrangés pour former le centre de la triple hélice. Chaque chaîne est déplacée par rapport à l'autre d'une rotation azimutale de  $108^\circ$  et une translation axiale de  $2.86 \text{ \AA}$ . L'axe d'une chaîne individuelle suit un chemin hélicoïdal de pas environ  $87 \text{ \AA}$ .

## Structure des atomes du squelette de la molécule de collagène dans la triple hélice. ( D'après Ramachandran ( 59 ) ).



Les trois chaînes individuelles de la figure ci-dessus sont nommées A, B, et C, et elles sont reliées entre elles par les coordonnées polaires cylindriques,  $r$ ,  $\phi$ , et  $z$  des atomes représentatifs des trois chaînes. L'axe  $z$  est perpendiculaire au plan de la figure et occupe le centre de la triple hélice. L'axe  $x$  correspond à  $\phi = 0$  coïncidant avec la ligne joignant le centre au carbone  $C_1$  de la chaîne A. Les relations spatiales entre les différents atomes sont les suivantes:

|            |           |   |                     |                       |
|------------|-----------|---|---------------------|-----------------------|
| $C_1(A) :$ | $r = r_0$ | A | $\phi = 0^\circ$    | $z = 0 \text{ \AA}$   |
| $C_1(B) :$ | $r = r_0$ | A | $\phi = -110^\circ$ | $z = 2.9 \text{ \AA}$ |
| $C_1(C) :$ | $r = r_0$ | A | $\phi = -220^\circ$ | $z = 5.8 \text{ \AA}$ |
| $C_4(A) :$ | $r = r_0$ | A | $\phi = -330^\circ$ | $z = 8.7 \text{ \AA}$ |

où  $r_0$  est la distance à l'axe d'un des atomes en positions 1, 4, etc. Il y a une répétition hélicoïdale dans chaque chaîne tous les 3 résidus. Par exemple, l'atome  $C_4$  peut être obtenu à partir de l'atome  $C_1$  par une rotation de  $+30^\circ$  autour de l'axe  $z$ , suivie d'une translation de  $8.7 \text{ \AA}$  le long du même axe. De plus, les trois chaînes sont liées topologiquement par une symétrie hélicoïdale gauche, qui peut être désignée par les opérateurs suivants :  $\phi = -110^\circ$  et  $z = 2.9 \text{ \AA}$

Exemple :

$$A \longrightarrow B : r_{jB} = r_{jA} \quad \phi_{jB} = \phi_{jA} - 110^\circ \quad z_{jB} = z_{jA} + 2.9 \text{ \AA}$$

$$A \longrightarrow C : r_{jC} = r_{jA} \quad \phi_{jC} = \phi_{jA} - 220^\circ \quad z_{jC} = z_{jA} + 5.8 \text{ \AA}$$

$r_j$ ,  $\phi_j$  et  $z_j$  sont les coordonnées polaires cylindriques de chaque atome de la chaîne et les relations ci-dessus sont applicables non seulement aux atomes de carbone, mais aussi à tous les autres atomes du squelette peptidique de la chaîne.

Aux conditions physiologiques, les molécules de collagène s'assemblent spontanément en fibres. Ces fibres, visibles au microscope électronique, sont des alignements de micro-crystallites plus ou moins parfaits. Elles comportent une série de striations d'une périodicité d'environ  $670 \text{ \AA}$  - Cette valeur est désignée par D. Ces stries sont la conséquence d'une discontinuité dans l'alignement parallèle des unités de tropocollagène dans la microfibrille. Deux molécules adjacentes parallèles sont séparées par un intervalle régulier de  $0.6 D$ , un "trou". Chaque molécule de tropocollagène a une longueur totale de  $4.4 D$ .

L'ensemble de ces molécules mises en registre , présente un décalage réparti aléatoirement , de 20 % de la distance couverte par une unité " tropocollagène" et le " trou " qui lui fait suite , soit  $4.4 + 0.6 D = 5 D$ . Pris perpendiculairement à l'axe de la microfibrille , c'est la juxtaposition des trous présents une fois sur cinq en moyenne qui crée les bandes claires. Et , c'est du chevauchement de toutes les unités tropocollagène dans l'espace  $0.4 D$  qui suit , que procèdent les bandes sombres. Une illustration schématique des fibres est représentée dans la figure 1 .

FIGURE 1.

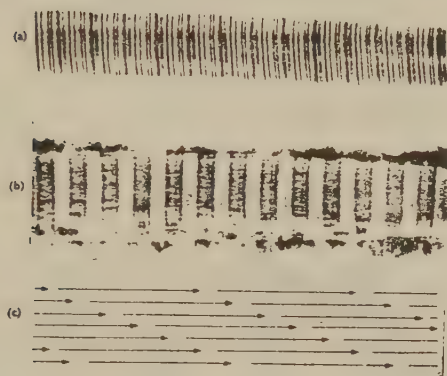


Figure 1: Micrographies électroniques de fibres de collagène . a ) Coloration positive avec acide phosphotungstique et acétate d'uranyle. b ) Coloration négative avec l'acide phosphotungstique à pH 7 . c ) Représentation schématique de l'arrangement des molécules dans les fibres. D'après Kühn ( 41 )

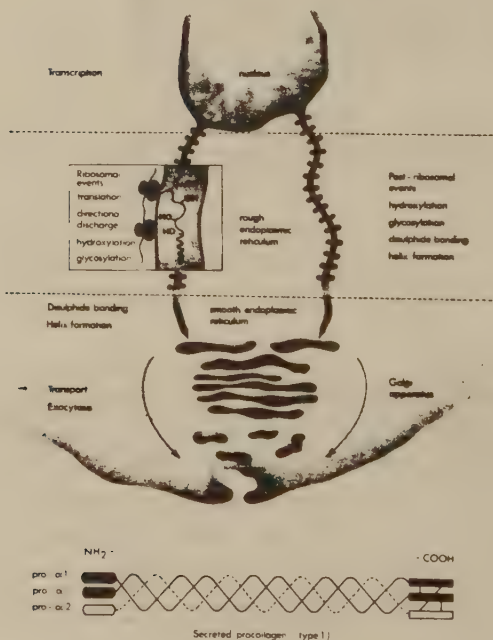
## Bref aperçu de la biosynthèse de la molécule de tropocollagène.

Contrairement à la très grande majorité des protéines, le collagène doit subir, après la synthèse ribosomale des chaînes, une série de transformations covalentes qui caractérisent sa maturation moléculaire.

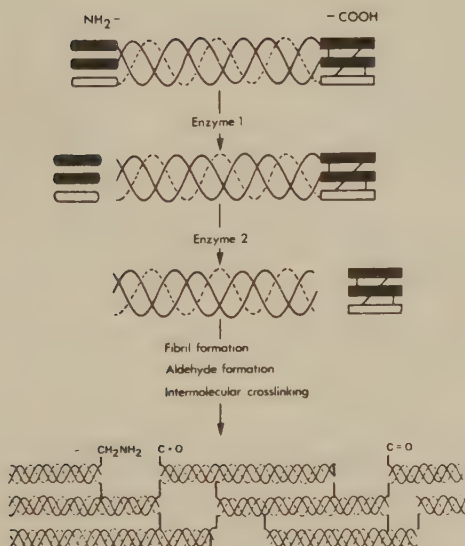
Les diverses étapes, à partir de l'assemblage des acides aminés sur le ribosome, jusqu'au dépôt des fibres dans la matrix extracellulaire sont résumées à la figure 2.

FIGURE 2.

## Représentation schématique de la synthèse et de la sécrétion du procollagène.



Résumé des étapes intervenant lors de la maturation extracellulaire du procollagène de type I.



Maladies du tissu conjonctif et incidences sur le collagène.

Avant de faire partie intégrante de la matrix intercellulaire, le collagène est soumis à un grand nombre de modifications postribosomales. Un mécanisme déficient de l'une ou l'autre de ces étapes va donc conduire à un collagène défectueux, don-

nant lieu à des anomalies physiologiques.

De nombreuses maladies du conjonctif sont dues à une altération dans la biosynthèse du collagène. Beaucoup d'entre elles affectent l'une ou l'autre des étapes mentionnées à la figure 2. Le syndrome d'Ehlers Danlos type VI ( 57 ) est dû par exemple , à une déficience de la lysyle hydroxylase , l'enzyme responsable de l'hydroxylation de la lysine. Une des caractéristiques de la maladie d'Ehler Danlos type VII est la présence de composants de haut poids moléculaire , contenant de la cystéine dans le collagène extrait de la peau des individus qui en sont atteints. Ceci suggère une déficience dans l'une des étapes de l'activation du procollagène en collagène ( 45 ) . Cette accumulation de procollagène a aussi été constatée chez les veaux atteints de dermatosparaxis ( 43 ) . Dans l'Ehler Danlos type V on constate seulement une diminution de l'activité de la lysyle oxydase . ( 13 ) D'autres maladies n'affectent pas la biosynthèse mais sont plutôt dûes à un contrôle déficient des proportions relatives des différents types synthétisés . Ainsi , dans l'Ehler Danlos type IV , par exemple , on a constaté une absence totale de synthèse de type III ( 58 ) . Ceci explique pourquoi des tissus tels que la peau , l'aorte , le tractus gastrointestinal , normalement riches en type III deviennent fragiles dans cette maladie.

Dans l'ostéogénèse imparfaite , au contraire , c'est le type III qui est synthétisé dans des proportions quatre fois plus importantes que la normale par rapport au type I (56 ) .

Les maladies mentionnées ci-dessus ont donc toutes pour cause directe un défaut dans la biosynthèse du collagène , et elles sont classées dans les maladies génétiques. Mais d'autres maladies somatiques , qui n'ont pas comme cause première une déficience du métabolisme du collagène , en dérivent indirectement. Un dépôt excessif de collagène dans certains tissus , tels que peau et un grand nombre d'organes internes , est une des manifestations les plus critiques de la forme systémique de sclérodéma ou sclérose systémique progressive (81 ) . Dans le cas de l'hypertension également , on a observé une augmentation de synthèse et du dépôt de collagène dans les parois artérielles. (34 ) . Les mécanismes qui provoquent cette synthèse accrue ne sont pas encore bien connus. Un deuxième aspect dans la pathogénèse de certaines maladies peut être la production de types de collagène non spécifiques. Par exemple, dans l'ostéoarthrite , il y a une synthèse de type I dans le cartilage à la place du type II (55 ) . Parmi les maladies somatiques, il faut aussi citer le lathyrisme , qui affecte surtout les ruminants ayant ingéré en quantités trop importantes des légumineuses produisant de l'aminopropionitrile, inhibiteur de la lysyle oxydase. La pathogénèse de nombreuses autres maladies serait due à une dégradation accrue du collagène plutôt qu'à une augmentation de sa syn-

thèse. Ainsi dans l'arthrite rhumatoïde , il y a une trop forte production de collagénase , ce qui contribue à la destruction des articulations(29 ) .

#### But du travail.

Notre premier objectif a été l'étude du collagène de veines saphènes , aucun travail approfondi n'ayant été entrepris sur ce matériel jusqu'à ce jour. La recherche d'une méthode de solubilisation adéquate , conservant l'intégrité structurale de la molécule , c'est à dire ne faisant appel à aucune protéolyse, ni à aucune hydrolyse chimique acide ou alcaline , a constitué la première étape. Il a semblé important d'isoler un matériel intact , sous forme native , de manière à élucider la structure des parties terminales.

Néanmoins , pour un examen de la totalité du collagène de la paroi veineuse , une hydrolyse a tout de même été nécessaire, pour les 4/5 du matériel insolubilisable par les seuls moyens physiques ; le type III n'est pas soluble sans le recours à la pepsine. Une meilleure connaissance des collagènes de la veine peut avoir une signification majeure pour expliquer les mécanismes qui règlent les fonctions des parois des vaisseaux afférents , conduisant des capillaires systémiques au coeur. Elle peut aussi permettre une nouvelle tentative de comprendre certaines maladies affectant la paroi veineuse , la maladie variqueuse par exemple.

En ce qui concerne la maladie variqueuse , des travaux anciens (74 , 75 ) avaient démontré une diminution de la quantité du collagène total et une augmentation de l'élastine et des protéoglycans. Plus récemment , des désorganisations fibrillaires ont également été constatées. Il serait donc intéressant de voir quels facteurs sont réellement affectés dans cette maladie. Il pourrait s'agir de proportions anormales des types I et III , ou d'une déficience dans la formation des cross-links d'où procède l'organisation des fibres dans la matrix intercellulaire.

## II. COLLAGENE DE VEINES SAPHENES SUPERIEURES DE VEAU.

### A. COLLAGENE SOLUBLE SANS UTILISATION DE PEPSINE.

#### 1. Préparation de collagène soluble à partir de veines saphènes de veau.

##### 1.1. Méthode d'extraction.

Les veines saphènes supérieures de veaux de quatre à six mois sont prélevées sur l'animal abattu, moins de dix minutes après la mort. Les dissections sont effectuées par le vétérinaire, dans des conditions voisines de la stérilité. Les fragments collectés sont immédiatement transférés dans une solution saline isoosmotique à 0 degrés C. Les récipients contenant les fragments de veines sont immergés dans de la glace pilée et transportés immédiatement au laboratoire. Toutes les opérations ultérieures sont effectuées en chambre froide à 4 degrés C. Les fragments sont alors disséqués pour les débarrasser de tout tissu adhérent ou de graisse puis lavés trois fois avec de l'eau distillée, pour enlever le maximum de sang coagulé.

Lorsqu'un stockage a été nécessaire, (dans le cas des veines variqueuses par exemple) les veines sont congelées en abaissant la température à - 25 degrés et conservées sous vide dans un dessiccateur.

Les veines, lavées à l'eau, sont ensuite lavées deux fois avec une solution à pH physiologique. Puis, elles sont découpées en morceaux de un centimètre de long et hachées à l'aide d'un hachoir à viande. Cette opération est répétée plusieurs fois afin d'obtenir une pulpe aussi fine que possible. Les fragments sont ensuite mis en suspension dans une solution d'acétate de sodium 0.5 M à pH 6.3, pendant 20 heures sous agitation. La dispersion est ensuite centrifugée à 1500 g, pendant une heure à 4 degrés C et, le surnageant est écarté. (Remarque : ce surnageant a été testé pour voir s'il contenait du collagène mais le test a été négatif.) Ce lavage dans l'acétate de sodium 0.5 M est répété deux fois, puis on recentrifuge à 1500 g, on lave à l'eau, on recentrifuge et on procède à la première étape de l'extraction proprement dite.

### Extraction au citrate.

La pulpe de veines après avoir été centrifugée est mise en suspension dans deux litres de citrate de sodium 0.1M pH 4.3 , refroidie à quatre degrés C et agitée pendant 20 heures . Suit une centrifugation à quatre degrés pendant 30 minutes et l'extraction est répétée 2 fois dans les mêmes conditions sur le sédiment obtenu . Les trois surnageants réunis sont finalement centrifugés à haute vitesse à 39.000 g pendant une heure et la phase soluble est dialysée contre une solution de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.02 M pH 8.2 pour induire la refibrillation. Ces fibres sont collectées par centrifugation. Le surnageant est éliminé . On extrait ainsi une première fraction de collagène , le collagène soluble dans le citrate.

Les sédiments restant après l'extraction au citrate sont lavés trois fois avec de l'eau distillée froide , et récoltés par centrifugation de 10 minutes à 8000 g . A ce stade , après l'enlèvement complet du citrate par plusieurs lavages à l'eau bidistillée suivis d'une centrifugation , les fragments sont immergés dans 2 litres d'acétone à quatre degrés , où ils sont agités pendant 15 heures . Cette suspension dans l'acétone permet de dissoudre les graisses et de dissocier les structures fibrillaires . Puis , après 15 heures , on laisse sédimenter et décanter l'acétone. Le matériel partiellement dégraissé est ensuite mis en suspension sous agitation dans 2 litres d'acétone , mais cette fois à - 30 degrés. Il est maintenu à cette température pendant 18 heures . On enlève le maximum d'acétone par décantation et on sèche les fragments sous pression réduite.

### Extraction à l'acide acétique.

Ce matériel sec est extrait sans délai avec 2 litres d'acide acétique 0.5 M , pH 2.8 à quatre degrés C. Après 60 heures d'agitation , on centrifuge la solution à 39.000 g. pendant trois heures et on filtre le surnageant sur de la laine de verre. L'extraction à l'acide acétique est répétée deux fois . La durée de ces 2 extractions supplémentaires ne dépasse jamais 48 heures. Les surnageants des trois extractions à l'acide acétique ne sont généralement pas mélangés mais traités séparément. La majeure partie du collagène se trouve dans le premier extrait. Le collagène extrait à l'acide acétique

est fibrillé par dialyse contre un tampon phosphate de sodium 0.02 M , pH 8.2, ou par neutralisation de la solution avec NaOH 30 % ajouté goutte à goutte . A ce stade , cette fraction peut être considérée comme suffisamment pure , à en juger par la composition en acides aminés ou l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Le degré de pureté est supérieur à 95 % . Les contaminants qui pourraient encore subsister , spécialement les protéoglycans , sont éliminés par des purifications ultérieures sur colonne de DEAE cellulose et de CM cellulose. ( Cf . Mémoire de thèse de L. Vadas.)

Mais ces purifications supplémentaires sont surtout nécessaires lorsqu'on veut entreprendre l'analyse des unités saccharidiques du collagène et des cross-links , ce qui n'a pas été l'objet du présent travail.

Le résidu restant après ces trois extractions par l'acide acétique peut ensuite être soumis à d'autres méthodes de solubilisation , mais cette fois après digestion partielle dans la pepsine. Ces extractions pepsiques seront décrites dans la deuxième partie de cet exposé.

#### 1.1.1. Rendement des différentes extractions.

Le rendement des différentes étapes est calculé en se référant à 18 Hyl par molécule de tropocollagène de poids moléculaire de 330.000. Le poids sec des veines a été déterminé sur des spécimens de veines saphènes lavés extensivement à l'eau distillée , dégraissés et séchés sous vide jusqu'à poids constant. Le contenu en collagène que l'on a trouvé pour la veine saphène supérieure , est en accord avec les résultats de Svejcar et al (74 , 75 ) et de Hebel ( 17 ) pour la veine saphène supérieure de veau. Ces résultats prennent en considération les différences connues dans le contenu en collagène entre les parties supérieures et inférieures de la veine chez le même animal.(66 )

Remarque : l'hydroxylysine a été prise comme référence de préférence à l'hydroxyproline habituellement utilisée , parce que dans notre cas , les valeurs trouvées pour l'hydroxylysine étaient beaucoup plus reproductibles , en dépit d'une proportion plus réduite sur le total des acides aminés. Cette détermination se situe dans un domaine suffisamment plus élevé que la zone d'erreur pour être statistiquement valable. En plus , de cette manière , on évite toute interférence avec l'élastine. La table 1 donne les valeurs trouvées pour les rendements aux différentes étapes. Le dosage du contenu en collagène de la veine saphène est de 48 % . Le poids sec des veines au départ est de 100 g. Le contenu en collagène de ces 100 g est donc de 47.8 g.

TABLE 1

|                                                             | Poids en grammes<br>du matériel total<br>extrait dans les<br>diff. étapes. | Poids en grammes<br>du collagène<br>extrait . | % de collagène<br>extrait. |
|-------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------|
| Lavage à l'acé-<br>tate.                                    | 10 g                                                                       | 0 g                                           | 0 %                        |
| Extraction au<br>citrate , +<br>dégraissage à<br>l'acétone. | 11 g                                                                       | 2 g                                           | 4.2 %                      |
| Premier extrait<br>à l'acide acé-<br>tique                  | 8 g                                                                        | 3.6 g                                         | 7.5 %                      |
| Deuxième ex-<br>trait à l'acide<br>acétique.                | 3.3 g                                                                      | 2 g                                           | 4.2 %                      |
| Résidu insoluble                                            | 63 g                                                                       | 40.2 g                                        | 84 .1 %                    |

Le collagène passant en solution représente donc le 15.9 % du total. D'autre part sur 100 g de poids sec au départ , 63 g restent insolubles . Le 84.1 % du collagène total reste donc dans le résidu.

## 1. 2 . Discussion sur l'extraction et le rendement.

Par notre méthode , le 16 % du contenu total en collagène de la veine saphène de veau a pu être solubilisé sans avoir recours à des enzymes protéolytiques tels que la pepsine , ou à un traitement alcalin hydrolysant. Ce rendement présente des variations de 1 à 2 % d'une extraction à l'autre , mais reste toujours dans le même ordre de grandeur. En utilisant d'autres méthodes précédemment décrites , seule une très faible partie du collagène de veine passe en solution. Le collagène de vaisseaux sanguins est reconnu comme étant particulièrement insoluble. Dans des tampons neutres et des acides organiques faibles moins de 1 % du collagène est solubilisé. ( 79 )

De même , dans des essais de solubilisation du collagène de peau , de tissu vasculaire et de leiomyome humain , c'est le collagène de tissu vasculaire qui passe en solution le plus difficilement. Après 4 jours à 4 degrés C dans 100 volumes de NaCl 1 M contenant 0.05 M Iris - HCl , pH 7.5 , suivis de 100 volumes d'acide acétique 0.5 M durant 4 jours , Chung et Miller ( 8 ) n'ont constaté aucune solubilisation du collagène de vaisseaux. C'est pourquoi , les auteurs qui ont réussi une mise en solution substantielle de collagène de tissu vasculaire ont eu recours à la pepsine. Même en l'utilisant le 35 % seulement du collagène de l'aorte et , le 40 % du collagène des valves cardiaques ont passé en solution. ( 79 , 11 )

D'autre part Henkel ( 30 ) a eu recours à un mélange de NaOH / monométhylamine / sulfate de sodium , pour obtenir seulement le 12.5 % du collagène d'aorte sous forme soluble , et ceci après 5 jours d'extraction.

Il semble donc que notre méthode pour extraire le collagène de veine saphène de veau soit particulièrement efficace; elle permet d'obtenir une quantité significative de collagène sous forme soluble sans aucun recours à une hydrolyse. Il n'y a pas d'explication certaine de son mode d'action. On peut cependant penser que deux étapes sont particulièrement importantes. Tout d'abord le broyage mécanique des veines en particules aussi fines que possible accroît au maximum le contact avec les différents solvants. D'autre part, la suspension de ce matériel dans l'acétone à -30 degrés C facilite la désaggrégation du réseau fibrillaire et la solvatation des protéines. Il faut cependant noter que l'âge du donneur est un facteur important pour la solubilité du collagène . Il est en effet reconnu que le vieillissement est très souvent accompagné par une diminution de la solubilité du collagène. Ceci est dû à une proportion de cross-links intermoléculaires toujours plus grande et à d'autres modifications chimiques dans l'association protéines - glycans. Notre méthode aurait une efficacité nettement moindre si on l'appliquait à des vaisseaux de bovidés adultes.

## 2. Homogénéité.

### 2.1. Matériel et méthodes.

#### 2.1.1. Dansylation.

La méthode originale de Gray et Hartley ( 26 ), qui implique l'urée 8 M et le bicarbonate de sodium dans un mélange d'eau - acétone a été testée. Mais , on a surtout eu recours à la version modifiée de Gray ( 27 ), qui nécessite une dénaturation au SDS dans un tampon N-éthyle morpholine. Cette méthode s'est révélée plus efficace que la méthode originale de Gray et Hartley , probablement à cause de la plus grande solubilité du collagène et de la chaîne  $\alpha_1$  dans ces conditions.

Après la dansylation , la protéine est précipitée par addition d'acétone , centrifugée , lavée et séchée.

L'hydrolyse est effectuée dans HCl 5.7 N , pendant 10 heures , sous vide dans un tube scellé. Après évaporation à sec de l'hydrolysate , le résidu est solubilisé dans la pyridine- eau 50 % . Les échantillons sont déposés sur une plaque de Silicagel en présence d'acides aminés dansylés témoins et la chromatographie est effectuée dans un solvant benzène / pyridine / acide acétique (16/4/1) pendant 3 à 4 heures. L'identification se fait à l'UV à 254 ou 366 nm.

#### 2.1.2. Détection du PCA terminal à l'aide de la PCA peptidase.

La pyrrolidonyle peptidase a été préparée selon la méthode de Doolittle et al ( 14 ) à partir d'une souche de *Pseudomonas fluorescens*. L'acide L-pyrrolidone carboxylique de référence provient de Aldrich Chemical Company Ltd , et la pyroglutamyle-L-alanine utilisée comme substrat synthétique de Vega Fox Biochemicals.

L'activité de la pyrrolidonyle peptidase a été testée en dosant les groupes amino libérés durant la réaction , par la méthode à la ninhydrine.( 31 ) Le PCA libéré a été caractérisé grâce la méthode oxydante de Reindel et Hoppe ( 63 ) par TLC sur feuille de polyamide. L'enzyme a été testé sur une fraction contenant  $\alpha_1$  et  $\beta_{11}$  en quantités égales. Un dosage qualitatif de PCA libéré a été effectué. On refait ensuite une dansylation sur le collagène après traitement avec la pyrrolidonyle peptidase pour détecter et éventuellement doser l'acide aminé en deuxième position libéré à son tour.

Remarque : cette dernière réaction n'a été faite que sur la chaîne  $\alpha_1$ .

## 2.2. Résultats.

### 2.2.1. Dansylation.

Beaucoup de travaux antérieurs ont démontré que le résidu N-terminal de la majorité des collagènes intacts de vertébrés était bloqué, vraisemblablement sous la forme de résidus pyroglutamyle. La dansylation a donc été entreprise plus pour démontrer l'intégrité des molécules de collagène et la non-contamination par un autre matériel d'origine protéique que pour la détection de l'acide aminé terminal.

En réponse à notre attente, aucun acide aminé dansylé n'a pu être détecté avant action de la peptidase. Même lorsque la quantité de collagène a été augmentée de dix fois par rapport aux concentrations de protéine normalement utilisées, les tests sont demeurés négatifs.

### 2.2.2. Détection de l'acide pyroglutamique terminal.

L'hypothèse selon laquelle l'acide aminé N-terminal était bloqué, en l'occurrence par un résidu pyroglutamique s'est révélée exacte. Après traitement de la chaîne  $\alpha_1$  du collagène avec la pyrrolidonyl peptidase, l'acide pyrocarboxylique a été libéré dans le surnageant, après précipitation de la protéine à l'éthanol.

D'autre part, une dansylation de la chaîne  $\alpha_1$  après enlèvement du PCA, a permis de détecter le résidu en deuxième position. Celui-ci n'a pu être déterminé avec certitude puisque dans nos conditions de séparation, Leu, Ile et Val ne peuvent être distingués. (La quantité d'enzyme disponible n'étant pas suffisante, une expérience de vérification par une chromatographie bidimensionnelle n'a pu être effectuée.) On peut cependant affirmer qu'il s'agit de l'un de ces trois acides aminés, et si l'on compare avec les séquences homologues déjà connues de chaîne  $\alpha_1$  du collagène, il est probable que cet acide aminé soit la leucine. La leucine intervient en deuxième position dans la chaîne  $\alpha_1$  du collagène de la peau de veau, de la peau de babouin et de celle d'homme. (2, 18).

## 2.3. Discussion.

L'absence de détection d'un acide aminé N-terminal sur le collagène entier et, la détection d'un acide aminé dansylé après traitement avec la pyrrolidonyl peptidase prouvent bien que les chaînes de collagène de veine, du moins la chaîne  $\alpha_1$ , ont leur extrémité N-terminale bloquées,

et que ce blocage est bien dû à un acide pyroglutamique.

D'autre part, la présence de cet acide pyroglutamique en position N-terminale est un bon indice de l'intégrité de la molécule de collagène extraite par notre méthode. Ce PCA n'existe, en effet que sur le collagène intact, n'ayant subi aucune atteinte protéolytique, ni clivage aspartique qui survient parfois en milieu acide ( $\text{pH} = 2 \text{ à } 3$ ). D'autres méthodes telles que l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS, l'analyse de la composition en acides aminés, etc, qui sont aussi des preuves de l'homogénéité de notre matériel sont discutées au chapitre suivant.

### 3. Caractérisation du collagène soluble.

#### 3.1. Composition en acides aminés.

##### 3.1.1. Matériel et méthodes.

La composition en acides aminés du collagène soluble intact extrait dans le citrate et dans l'acide acétique 0.5M a été déterminée en utilisant les méthodes d'hydrolyse décrites par Moore et Stein ( 53 ). Des fractions de 0.2 et 0.3 mg de protéine sont dissoutes dans du HCl 6 N et hydrolysées dans des tubes Pyrex, scellés sous vide, pour une durée de 24, 48 et 72 heures, à 108 degrés C.

Les hydrolysats sont ensuite évaporés à sec, puis, après deux lavages à l'eau suivis d'une évaporation à sec, ils sont repris dans 0.2 ml de tampon citrate de sodium 0.02 M pH 2.2.

L'analyse est effectuée avec un analyseur d'acides aminés Beckman, modèle 120 C muni d'une colonne de 65 cm chargée de microsine Beckman AA 15. L'élution est faite à l'aide d'un système à trois tampons d'après Gürther ( 28 ). Le pic de l'hydroxyproline, qui épaule partiellement celui de l'acide aspartique, a été intégré à 440 nm en utilisant un facteur de correction établi par une série de calibrations comprenant des rapports d'hydroxyproline et d'acide aspartique connus. L'hydroxylysine, par contre, sort en un pic bien résolu en avant de l'histidine.

Des déterminations supplémentaires ont été faites spécifiquement pour le contenu en Hyp afin de vérifier les résultats de l'analyseur pour cet acide aminé particulier. Ces déterminations ont été effectuées par la méthode de Stegemann ( 73 ).

### 3.1.2. Résultats et discussion.

La composition en acides aminés du collagène de veine est donnée dans les tables 2 A et 2 B.

Ces chiffres représentent une moyenne de 9 analyses indépendantes , à partir de préparations différentes , à trois temps d'hydrolyse différents (24 , 48 , et 72 heures.) . On a ainsi tenu compte des pertes de la sérine et de la thréonine au cours du temps , en extrapolant leurs valeurs respectives au temps zéro. Pour Ile et Val , dont les liaisons peptidiques s'hydrolysent lentement , une extrapolation à temps infini a été faite.

Les résultats sont donnés en ‰ , ce qui est habituellement utilisé en ce qui concerne le collagène. La longueur totale d'une chaîne représente en effet environ 1000 acides aminés.

TABLE 2 A

| Nom de l'acide aminé | Résultats en ‰ | $\sigma$ |
|----------------------|----------------|----------|
| Hyp                  | 95             | 1.9      |
| Asx                  | 50.6           | 1.00     |
| Thr                  | 20.2           | 0.38     |
| Ser                  | 39.8           | 0.98     |
| Glx                  | 83.4           | 1.05     |
| Pro                  | 106            | 1.05     |
| Gly                  | 306            | 2.5      |
| Ala                  | 112.2          | 1.51     |
| Val                  | 24.6           | 0.82     |
| Met                  | 5.4            | 0.28     |
| Ile                  | 14.1           | 0.4      |
| Leu                  | 30.8           | 1.08     |
| Tyr                  | 5.7            | 0.32     |
| Phe                  | 14.8           | 0.43     |
| Hyl                  | 5.9            | 0.18     |
| His                  | 6.1            | 0.29     |
| Lys                  | 29.2           | 0.63     |
| Arg                  | 50.1           | 1.39     |



Les résultats de l'analyse des acides aminés du collagène de veine saphène de veau , comparés à ceux d'autres collagènes de type I , ne présentent pas de variations importantes. On peut donc conclure que cette fraction de collagène isolée sous forme intacte et soluble correspond à un collagène " classique " de type I, sans contamination significative avec un collagène d'un autre type ou avec une autre protéine. La seule différence à prendre en considération ici est la proportion un peu moins élevée de Gly. Elle est légèrement inférieure au 1/3 des acides aminés totaux. Ceci pourrait éventuellement être dû à l'existence de plus grandes extensions C terminales. Les composants en acides aminés des parties terminales non hélicoïdales ne présentent pas en effet le schéma classique de séquence répétée caractérisé par une glycine tous les trois acides aminés.

Remarque : les compositions en acides aminés sont identiques , qu'il s'agisse du collagène extrait par le citrate ou par l'acide acétique 0.5 M . Dans les deux cas , on est en présence de collagène de type I.

### 3.2. Séparation des chaînes.

#### 3.2.1. Matériel et méthodes. )

##### 3.2.1.1. Colonne de CM cellulose.

La méthode de chromatographie utilisée pour la séparation des chaînes du collagène est celle préconisée par Bornstein ( 3 ) . Mais , l'addition d'urée 1 M ( Schwarzmann, ultrapure ) selon Miller ( 50 ) , s'est révélée très utile pour améliorer le rendement , en augmentant la solubilité du collagène. Quelques modifications ont cependant été faites par rapport à ces méthodes : la dénaturation thermique a été entreprise à 50 degrés pendant une heure et la température de la colonne augmentée à 45 degrés C pour éviter toute refibrillation. D'autre part , le gradient linéaire entre 0.02 M et 0.12 M en NaCl au lieu de se limiter à l'intervalle allant de 0 à 0.1 M permet une meilleure résolution du pic de  $\alpha_2$  . Les dimensions de la colonne sont de 2.5 X 25 cm . La résine est une carboxy-méthyle cellulose Whatman CM 32 (1meq /g ) et la vitesse d'élu-tion est de 106 ml /heure. La lecture de l' éluat est faite à 230nm . Le collagène lyophilisé est dissous dans le tampon de départ , acétate de sodium 0.06 M , NaCl 0.02 M , urée 1M , pH 4.8 , sous agitation à 4 degrés C , pendant toute une nuit. Puis il est chauffé pendant une heure à 50 degrés C avant d'être appliqué sur la colonne.

Une fois l'échantillon chargé, on lave avec le tampon de départ afin d'éluer tout le matériel qui ne se serait pas fixé., puis on applique le tampon du gradient. Ce gradient est linéaire ; le volume total est de 800 ml.

Les fractions  $\alpha_2$  et  $\beta_{12}$ , qui sont mal séparées après une seule chromatographie, sont chargées une deuxième fois sur une colonne de CM cellulose, mais en utilisant un gradient plus étendu, le volume total étant de 1600 ml. Ce gradient est maintenu entre 0.02 M et 0.12 M. en NaCl.

### 3.2.1.2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.

La méthode est celle décrite par Laemmli ( 42 ). La concentration en acrylamide du gel de séparation est de 6 % et celle du " stacking gel " est de 3 %. L'électrophorèse est faite sur un gel plan vertical, " slab ", d'épaisseur de 1.5 mm. Les gels sont préparés à partir d'une solution stock de 30% (poids/poids) en acrylamide, et 0.8 % en N-N' bis-méthylène acrylamide. Les concentrations finales dans le gel de séparation sont les suivantes : 0.375M Tris-HCl, pH 8.8, et 0.1% SDS. Les gels sont polymérisés chimiquement par l'addition de 0.025 % par volume de tétraméthylène diamine ( TEMED ) et de persulfate d'ammonium.

Les "stacking gels " à 3 % en acrylamide ont une longueur de 1 cm environ, et contiennent 0.125M Tris-HCl (pH 6.8), et 0.1 % de SDS. La polymérisation chimique se fait de la même manière que pour le gel de séparation.

Le tampon aux électrodes (pH 8.3) contient 0.025 M Tris et 0.192 M Gly et 0.1 % SDS. L'échantillon appliqué sur le gel est préalablement dissous dans un tampon contenant : 0.0625 M Tris-HCl (pH 6.8), 2 % SDS, 10 % glycérol, 5 % mercapto-éthanol et 0.001 % de bleu de bromophénol.

L'électrophorèse se fait en appliquant un courant constant de 30 mA, pendant environ 5 heures. La coloration est effectuée à l'aide du bleu de Coomassie G 250 :

|              |                  |           |
|--------------|------------------|-----------|
| Solution 1 : | Coomassie G 250  | : 1 g     |
|              | Méthanol         | : 200 ml  |
|              | H <sub>2</sub> O | : 20 ml   |
| Solution 2 : | Acide acétique   | : 40 ml   |
|              | H <sub>2</sub> O | : 180 ml. |

On immerge les slabs dans un mélange 1/1 des deux solutions ci-dessus et on chauffe à 60 degrés C pendant 1 heure. La décoloration s'effectue dans de l'acide acétique 7 %, pendant 24 heures.

### 3.2.1.3. Composition en acides aminés.

Elle est effectuée sur chaque chaîne isolément par la méthode décrite précédemment en 3.1.1.

### 3.2.2. Résultats.

#### 3.2.2.1. Séparation des chaînes sur CM cellulose.

Voir Figures 1, 2, 3, et 4.

#### 3.2.2.2. Séparation des chaînes et degré de pureté sur gel SDS.

Voir Figures 5 et 6.

#### 3.2.2.3. Composition en acides aminés de chaque chaîne.

Voir Table 2 B.

### 3.2.3. Discussion.

Les résultats d'analyse des différentes chaînes du collagène de veine confirment qu'il est bien de type I, par comparaison avec des standards connus d'autre origine. Les profils d'élution de la colonne de CM cellulose correspondent à ceux déjà trouvés pour d'autres collagènes de type I. Il ne nous a pas été possible de séparer complètement  $\alpha_1$  et  $\beta_{11}$  mais, par contre,  $\alpha_2$  et  $\beta_{12}$  ont pu être résolus sous une forme pure. Les extraits dans le citrate et dans l'acide acétique donnent des profils équivalents, mais on peut cependant noter que dans le cas du collagène extrait par le citrate, il y a une quantité relativement plus élevée de monomères  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  que dans l'extrait par l'acide acétique. De même, les composants  $\beta$  sont plus importants dans le collagène extrait par l'acide acétique. Les inégales solubilités de ces deux collagènes proviennent certainement de différences dans les cross-links inter et intra moléculaires. Plus la quantité de crosslinks est élevée, plus la solubilité diminue. On n'a constaté aucune différence entre ces deux collagènes s'agissant soit de leur poids moléculaire, soit de leur composition en acides aminés.

FIGURE 1.

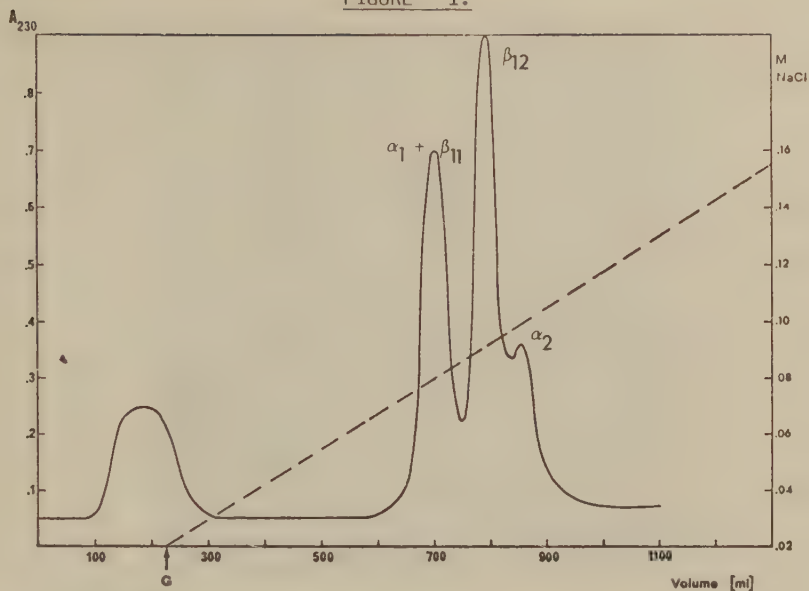


Figure 1 : Séparation sur colonne de CM cellulose des chaînes du collagène extrait par l'acide acétique 0.5 M. Tampon : Acétate de Na 0.06 M, pH 4.8 + 0.02 M NaCl + 1 M urée, Gradient linéaire de 0.02 M à 0.12 M en NaCl. Volume total : 800 ml.

Figure 2 : Séparation des chaînes de collagène extrait par le citrate. Mêmes conditions expérimentales que pour la figure 1.

FIGURE 2.

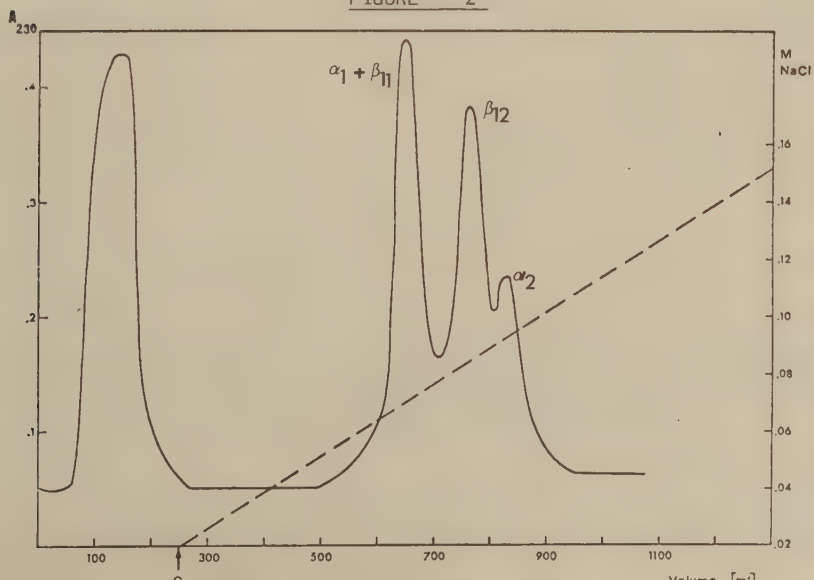


FIGURE 3

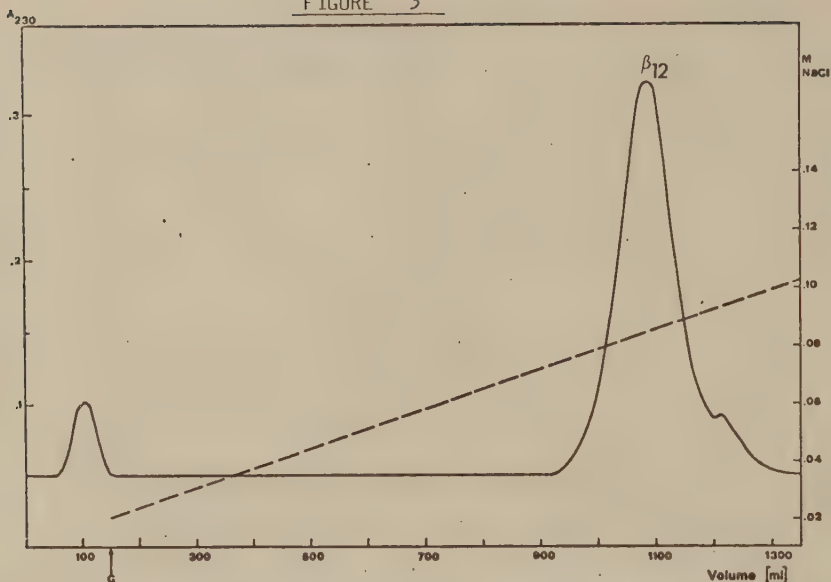


Figure 3 : Rechromatographie de la fraction  $\beta_{12}$  éluée de la colonne de CM cellulose de la figure 1, sur une deuxième colonne de CM- cellulose. Mêmes conditions que pour la figure 1 , mais gradient plus étendu . Volume total: 1600 ml.

Figure 4 : Rechromatographie de la fraction  $\alpha_2$  de la colonne de CM cellulose de la figure 1 . Mêmes conditions que pour la figure 3.

FIGURE 4

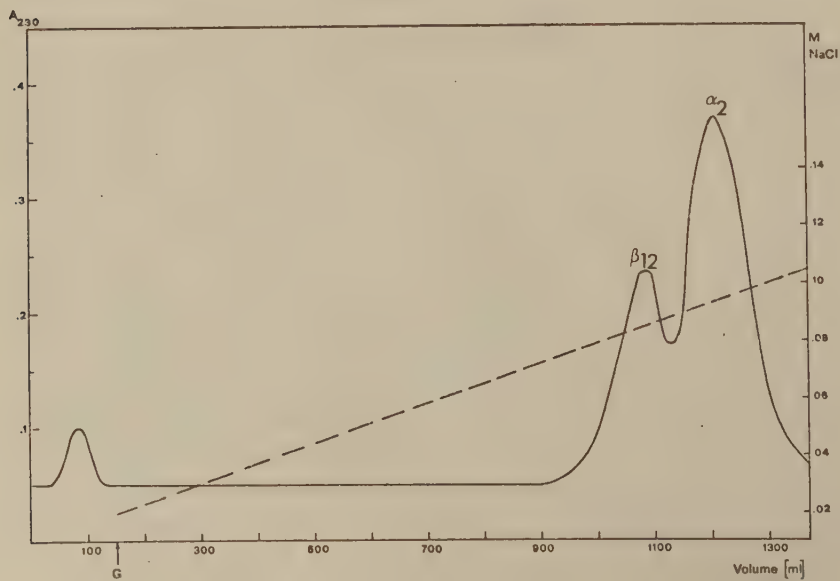


FIGURE 5

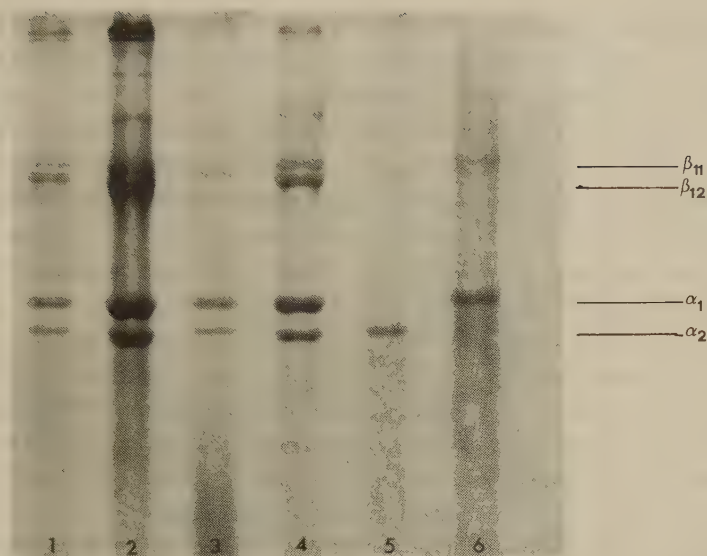


Figure 5 : Gels de polyacrylamide 6 % en présence de SDS pour les différentes extractions de collagène. 1) Collagène de veines variqueuses extrait dans l'acide acétique. 2) Collagène de veines saphènes de veau extrait dans l'acide acétique. 3) Collagène de veines variqueuses extrait dans le citrate. 4) Collagène de veines de veau extrait dans le citrate, 5)  $\alpha_2$  6)  $\alpha_1$ .

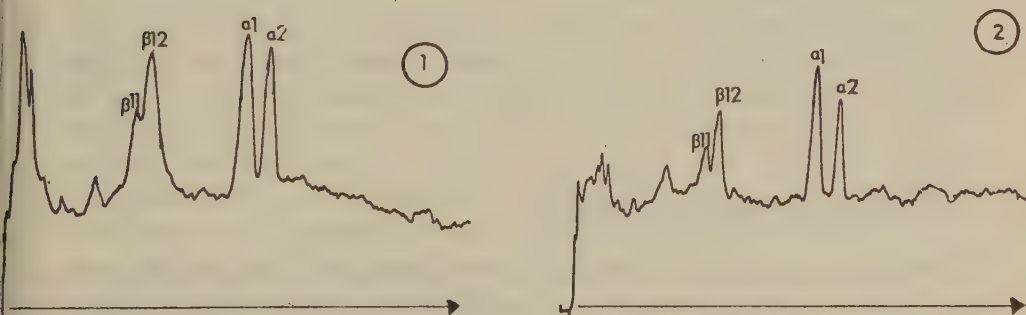


Figure 6 : " Scanning " des gels de polyacrylamide 6 % en présence de SDS.

- 1) Collagène soluble dans l'acide acétique.
- 2) Collagène soluble dans le citrate de sodium.

La seule divergence constatée est celle des proportions respectives en composants  $\alpha$  et  $\beta$ . Dans le spectre d'élution des chaînes sur CM cellulose, on note la présence d'un pic non retenu qui est élué avant l'application du gradient. Il présente une grande absorbance à 230 nm, mais la quantité de matériel retrouvée dans cette fraction a cependant un poids faible. Ce pic contient donc très peu de collagène, mais aussi un autre matériel contaminant, certainement constitué par des protéoglycans ou d'autres glycoprotéines acides.

Les résultats obtenus sur gel SDS confirment ceux obtenus sur CM cellulose sur tous les points, y compris celui des proportions relatives de  $\alpha$  et  $\beta$ . La composition en acides aminés de chaque chaîne isolée comporte des différences intéressantes par comparaison avec celle d'autres collagènes de type I déjà étudiés. (voir Table 2 B). La chaîne  $\alpha_2$  contient davantage d'acide aspartique, d'hydroxylysine, d'histidine, et d'acides aminés neutres que la chaîne  $\alpha_1$ . Inversement, elle contient une plus faible quantité d'acide glutamique, de proline, d'alanine et de lysine. Ces traits structuraux sont communs aux chaînes  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  d'espèces et de tissus différents. Le collagène de type I extrait de la veine saphène de veau présente lui aussi ces mêmes divergences entre les deux chaînes. Il faut cependant noter deux points intéressants. Pour de nombreux collagènes déjà décrits dans la littérature, les deux chaînes contiennent une quantité équivalente de sérine; or, la chaîne  $\alpha_2$  de notre collagène contient sensiblement plus de sérine que la chaîne  $\alpha_1$ . D'autre part, l'acide glutamique est en quantité plus grande dans  $\alpha_2$  que dans  $\alpha_1$ , contrairement aux données concernant les autres collagènes. Les divergences sont donc plus grandes pour la chaîne  $\alpha_2$ , surtout en ce qui concerne la sérine et l'acide glutamique.

D'une façon générale, la collagène de veine saphène contient plus d'acide glutamique, moins de proline et un peu moins de glycine que les autres collagènes de type I. La quantité de tyrosine est, elle, notablement plus élevée.

### 3.3. Détermination du poids moléculaire.

Les déterminations de poids moléculaire du collagène effectuées sur gel de polyacrylamide en présence de SDS, par comparaison avec des protéines globulaires de référence, ne nous a pas permis d'avoir des résultats satisfaisants. Le fait que le collagène soit une protéine fibrillaire, et de plus, qu'elle contienne des unités saccharidiques, joue certainement un rôle important.

Mais, la distance de migration de notre collagène et de ses différentes sous-

unités sur gel d'acrylamide 6% en présence de SDS est absolument comparable à celle du collagène soluble de peau de veau( Worthington ). De même , des études faites au microscope électronique sur des fibres SLS , par L. Vadas (83 ) , ont démontré que la longueur d'une chaîne correspond bien à 2800 nm , ce qui est la dimension habituellement citée dans la littérature.

On peut donc estimer que notre collagène ne diffère pas , quant à son poids moléculaire , des autres collagènes déjà étudiés. Le poids moléculaire d'une chaîne se situerait donc entre 95.000 et 110.000 .

### 3.4. Dosage des sucres à l'anthrone.

#### 3.4.1. Matériel et méthode.

La méthode est celle préconisée par J.H. Roe ( 67 ) .

Le réactif à l'anthrone est une solution contenant 0.05 % d'anthrone , 1 % de thiourée , et 60 % en volume d'acide sulfurique.

Le standard utilisé est le glucose ou le galactose , ou un mélange des deux sucres dans des concentrations connues.

#### 3.4.2. Résultats et discussion.

La quantité globale de sucres trouvée dans notre collagène se situe entre 2.5 et 4 % . Dans les collagènes de vertébrés , le contenu total en unités saccharidiques constitue habituellement moins de 2 % du poids sec total de la protéine. ( 71 ). Les principaux constituants en hydrates de carbone des différents collagènes de vertébrés sont généralement le glucose et le galactose.

Une analyse détaillée des unités saccharidiques du collagène de veine , quantitative et qualitative , est rapportée dans le travail de thèse de L. Vadas (83 ) . La proportion plus importante de résidus glucose et galactose et surtout la présence d'autres unités saccharidiques est à noter ; en particulier , la découverte du xylose est spécialement intéressante.

### 3.5. Peptides au CNBr de la chaîne $\alpha_1$ du collagène de veine.

#### 3.5.1. Matériel et méthodes.

##### 3.5.1.1. Réaction au bromure de cyanogène.

La réaction a été effectuée d'après la méthode de Eyre et Glimcher ( 22 )  
On place le collagène ou la chaîne  $\alpha_1$  sous agitation dans 70 % d'acide formique, sous azote, en utilisant un rapport molaire CNBr /Met d'environ 150 /1, et ceci, à 30 degrés pendant 4 heures. Puis la solution est diluée 10 fois avec de l'eau bidistillée avant d'être lyophilisée. Le solide est redissous dans de l'eau bi-distillée et relyophilisé.

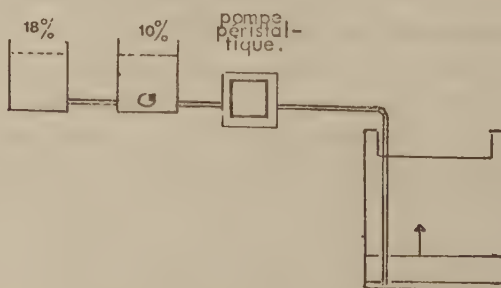
##### 3.5.1.2. Electrophorèse sur papier suivie par une chromatographie descendante.

L'électrophorèse se fait à 2000 V ( environ 50 mA ) à pH 3.6 . La chromatographie descendante se fait dans un tampon butanol/ acide acétique / H<sub>2</sub>O ( 3 / 1 / 1 ) pendant 24 heures. Les spots sont révélés à la ninhydrine.

##### 3.5.1.3. Séparation des peptides CNBr du collagène sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.

La méthode est celle de Laemmli ( 42 ) . L'électrophorèse est faite sur un gradient d'acrylamide entre 10 et 18 % . ( ) . Le " stacking " gel est toujours à 3 %. Les solutions stock nécessaires à la préparation du gel ont été décrites en 3.2.1.2.. Le remplissage du gel se fait selon le schéma ci-dessous :

Schéma de remplissage d'un gel gradient.



Les peptides sont détectés par la coloration au bleu de Coomassie ( Méthode décrite en 3.3.1.2. ) Mais dans certains cas , une détection par fluorescence s'est révélée nécessaire. Celle-ci nécessite l'emploi de la fluoescamine . Dans ce cas , le tampon de dissolution est modifié , le pH de réaction devant être basique.

|                            |                     |               |
|----------------------------|---------------------|---------------|
| Tampon de solubilisation : | Mercapto éthanol    | : 50 $\mu$ l  |
|                            | SDS 20 %            | : 500 $\mu$ l |
|                            | Borate pH 8         | : 300 $\mu$ l |
|                            | Bleu de bromophénol | : 100 $\mu$ l |
|                            | H <sub>2</sub> O    | : 3.05 ml     |

L'échantillon est dissous dans le tampon ci-dessus et bouilli pendant 1 ou 2 minutes , puis refroidi. On ajoute 10 % d'une solution de fluoescamine dans l'acétone ( 50 mg / ml ) puis 10 % de glycérol. La réaction avec la fluoescamine est instantanée. On applique l'échantillon sur le gel et on le détecte par l'émission de fluorescence à une longueur d'onde d'excitation de 390 nm et de 475 à 490 nm à l'émission.

#### 3.5.1.4. Séparation des peptides CNBr de la chaîne $\alpha_1$ du collagène sur une colonne de phosphocellulose.

La méthode est celle de Kang et col . ( 39 ) . La chromatographie est effectuée sur une colonne de 2.5 X 25 cm , chauffée à 43 degrés C. Le support utilisé est la phosphocellulose Whatman " floc " , lavée recyclée et équilibrée dans un tampon formate de sodium 0.001 M , pH 3.6. Le gradient est un gradient linéaire en NaCl de 0 à 0.6 M , pour un volume total de 1600 ml . Les fractions collectées sont de 6 ml et l'absorbance est lue à 230 nm. Cette colonne permet une séparation des peptides  $\alpha_1$ CB<sub>1</sub> ,  $\alpha_1$ CB<sub>2</sub> et  $\alpha_1$ CB<sub>3</sub> . Les peptides restant sur la colonne sont élués au moyen d'une solution de NaCl 1 M . Ils sont ensuite dessalés puis remis en solution et transférés sur une colonne de CM cellulose. Le dessalage est effectué par passage sur une colonne de Bio-Gel P2 ( 200 -400 mesh) dans de l'acide acétique 0.1M ou sur Séphadex G 15 dans de l'acétate d'ammonium 0.1 M.

#### 3.5.1.5. Séparation des peptides CNBr provenant de la chaîne $\alpha_1$ du collagène sur colonne de CM cellulose.

La méthode est celle de Kang et al . ( 39 ) La colonne dont les dimensions sont de 2.5 X 15 cm , est chauffée à 43 degrés C. Elle est remplie avec de la

CM cellulose Whatman CM 32 , lavée , recyclée , puis équilibrée dans un tampon formate de sodium 0.01 M , pH 3.4 + 0.05 M en NaCl.

Le gradient est linéaire entre 0.05M et 0.15 M en NaCl pour un volume total de 1600 ml . L'échantillon est dissous dans 10 ml de tampon initial . Le dessalage se fait comme ci-dessus , sur Bio-Gel P2 ou sur Sephadex G 15.

### 3.5.1.6. Composition en acides aminés.

Méthode déjà décrite en 3.1.1.

### 3.5.2. Résultats et discussion.

#### 3.5.2.1. Séparation des peptides par électrophorèse sur papier et chromatographie descendante.

Cette méthode ne s'est pas révélée être d'une grande efficacité, le poids moléculaire des peptides étant trop élevé et la différence entre eux trop peu marquée. On obtient , par cette méthode trois classes de peptides et une grande partie du matériel ne migre pas, probablement à cause de son trop grand poids moléculaire. On a donc eu recours à une méthode plus efficace pour la séparation des peptides au CNBr . L'électrophorèse sur gel gradient d'acrylamide s'est révélée beaucoup plus intéressante.

#### 3.5.2.2. Electrophorèse sur gel gradient d'acrylamide.

Les résultats obtenus par cette méthode sont illustrés dans la figure 7 . Elle permet d'identifier les peptides au bromure de cyanogène et de comparer notre collagène avec un collagène standard. Elle permet aussi de séparer les peptides  $\alpha_2\text{CB}_4$  ,  $\alpha_1\text{CB}_8$  et  $\alpha_1\text{CB}_7$  avec une bonne résolution, ce qui n'est pas le cas avec un gel de 10 % sans gradient. On peut conclure à la pureté de notre collagène extrait sous forme native , sans recours à la pepsine. Il consiste essentiellement en type I . Il n'y a , en effet aucune contamination de peptides de type III , car le peptide le plus caractéristique de ce type , à savoir  $\alpha_1(\text{III})\text{CB}_{1,8,2}$  , est totalement absent de nos préparations. A l'aide de ce gel-gradient , on retrouve donc tous les peptides CNBr du collagène , à l'exception cependant du peptide  $\alpha_1\text{CB}_1$  et des autres

FIGURE 7

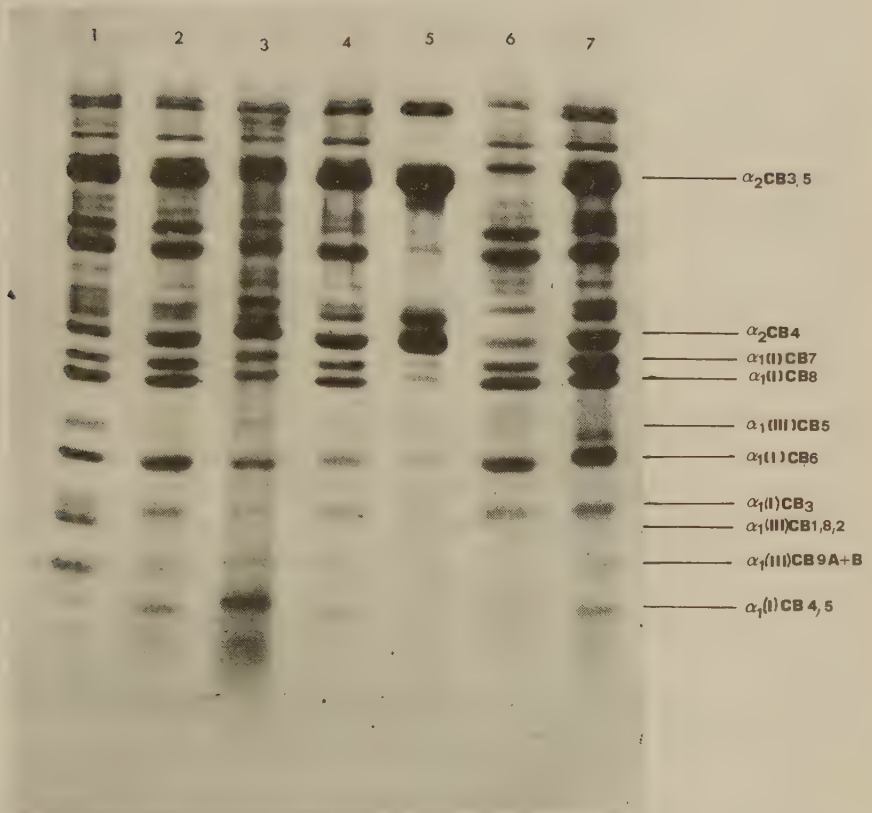


Figure 7 :Electrophorèse sur gel gradient d'acrylamide (10 à 18 %) des peptides CNBr du collagène .

1) Collagène de veines de veau extrait par la pepsine.

2) Collagène de veines de veau extrait par l'acide acétique et purifié sur DEAE cellulose. 3 ) Collagène standard de type I de peau de poulet

4)  $\beta_{12}$ , 5)  $\alpha_2$ , 6)  $\alpha_1 + \beta_{11}$ , 7) Collagène de veines de veau

extrait par l'acide acétique , avant purification sur DEAE.

FIGURE 8

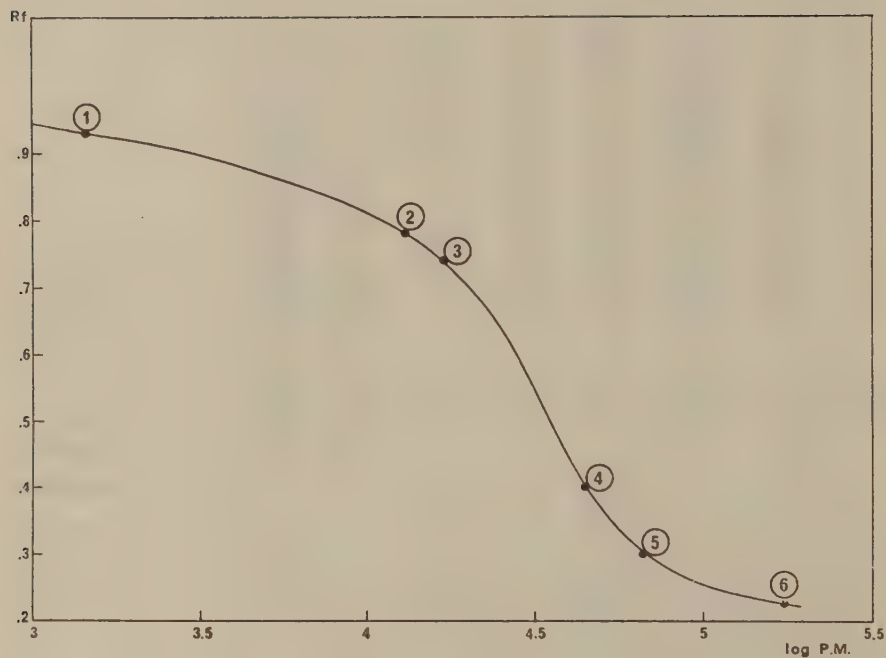


Figure 8 : Test du gel gradient 10 à 18 % avec des protéines standards.

|                        |              |
|------------------------|--------------|
| 1 : bacitracine        | PM = 1450    |
| 2 : Cytochrome C       | PM = 13.000  |
| 3 : Myoglobine         | PM = 17.000  |
| 4 : Ovalbumine         | PM = 45.000  |
| 5 : Albumine bovine    | PM = 66.000  |
| 6 : $\gamma$ Globuline | PM = 160.000 |

peptides de petit poids moléculaire de la chaîne  $\alpha_2$ . Le peptide  $\alpha_1 \text{CB}_1$  dont le poids moléculaire est très faible, est absent de nos déterminations sur gel. Cette absence pourrait être due à une migration trop rapide, qui le ferait sortir du gel, ou encore, à une élution spontanée hors du gel lors des diverses manipulations nécessaires à la coloration. La deuxième hypothèse semble la plus probable, car sur ce même gel, la bacitracine de poids moléculaire 1450 reste visible et migre environ  $\frac{1}{2}$  cm avant le front marqué par le bleu de bromophénol.

Ce gel a été testé avec une série de protéines globulaires de poids moléculaire connu, à savoir la bacitracine, le cytochrome C, la myoglobine, l'ovalbumine, le sérum albumine bovine et la  $\gamma$ globuline. Ces différentes protéines ont fourni l'image de séparation de la figure 8. Cette méthode permet d'avoir une bonne résolution, surtout pour les poids moléculaires situés entre 15.000 et 45.000.

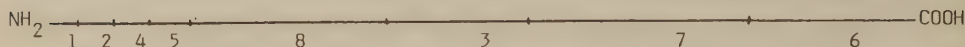
D'autre part, si l'on compare les poids moléculaires des peptides au CNBr du collagène avec les protéines globulaires testées, on se rend compte que les peptides migrent à des distances trop faibles. Ce comportement " anormal " des peptides de collagène a été également constaté par Rao et Adams. ( 60 ) Ces auteurs ont testé les peptides CNBr du collagène, en parallèle avec des protéines globulaires de poids moléculaire équivalent. Ils ont remarqué que les peptides étaient élués du Bio-Gel A 1.5 M ( 8 % agarose ) plus rapidement que les protéines de même P.M.

Ces peptides de collagène se comportent comme s'ils avaient un poids moléculaire plus élevé que les références. La même constatation a été faite par Furthmayr et Timpl ( 24 ) dans la migration par électrophorèse sur gel en présence de SDS. La mobilité plus faible des chaînes de collagène a été attribuée à la rigidité des chaînes polypeptidiques, même sous leur état dénaturé, en raison des restrictions stériques imposées par leur contenu élevé en résidus proline et hydroxyproline. Le fait que le collagène soit une glycoprotéine pourrait aussi expliquer ces différences de comportement. Les peptides de collagène migrent en moyenne sur notre gel-gradient comme s'ils avaient un PM de 10.000 plus élevé que leur poids moléculaire réel. Ainsi le peptide  $\alpha_1 \text{CB}_2$ , poids moléculaire 3200, migre à la même distance que le cytochrome C de poids moléculaire 13.000. Il faut remarquer que ce dernier peptide n'a pu être mis en évidence par une simple coloration au bleu de Coomassie, mais qu'il a fallu faire appel à la fluorescamine pour le localiser. Pourquoi ce peptide résiste-t'il à la coloration au bleu de Coomassie? Peut-être simplement diffuse-t'il hors du gel lors du processus de coloration, en raison de son faible poids moléculaire ?

Les poids moléculaires réels des peptides CNBr de la chaîne  $\alpha_1$  du collagène soluble de peau de veau sont les suivants ( 61 ) :

|                 |   |        |
|-----------------|---|--------|
| CB <sub>1</sub> | : | 1980   |
| CB <sub>2</sub> | : | 3299   |
| CB <sub>4</sub> | : | 4448   |
| CB <sub>5</sub> | : | 3760   |
| CB <sub>8</sub> | : | 24.414 |
| CB <sub>3</sub> | : | 13.481 |
| CB <sub>7</sub> | : | 24.066 |
| CB <sub>6</sub> | : | 19.085 |

L'ordre de leur position le long de la chaîne est le suivant :



Il est donc intéressant de constater que notre méthode permet une bonne séparation de peptides de poids moléculaire aussi proche que CB<sub>7</sub> et CB<sub>8</sub>.

En conclusion, on peut remarquer le haut degré d'homologie trouvé pour les peptides CNBr de la chaîne du collagène de différentes espèces. Comme Bornstein l'a souligné ( 4 ), cette similarité dépasse de loin le degré d'homologie trouvé dans les autres protéines, comme l'hémoglobine ou le cytochrome C par exemple. Les divergences les plus importantes entre les différents collagènes de type I résident dans leurs parties N ou C terminales. C'est pourquoi nous avons tenté une séparation de ces peptides sur colonne, afin de pouvoir isoler principalement le peptide  $\alpha_1$  CB<sub>1</sub>, qui est N-terminal.

#### 3.5.2.3. Séparation des peptides CNBr de la chaîne $\alpha_1$ du collagène de veine sur colonne de phosphocellulose et de CM cellulose.

Les graphes d'élution de ces deux colonnes sont reproduits dans les figures 9 et 10.

FIGURE 9

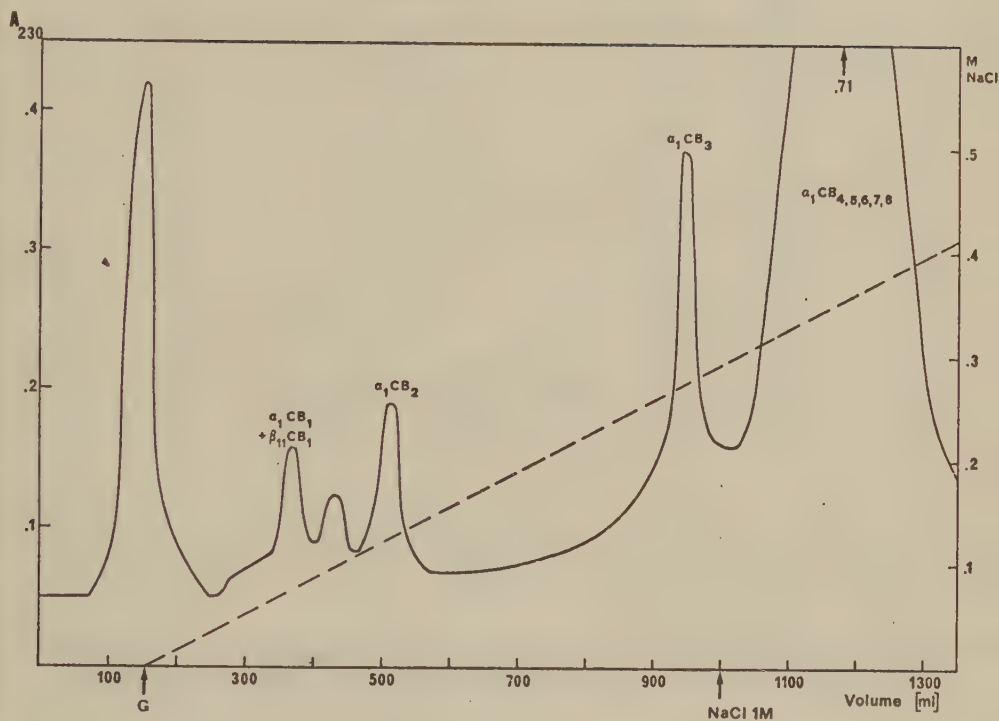


Figure 9 : Séparation des peptides CNBr de la chaîne  $\alpha_1$  du collagène de veine sur colonne de phosphocellulose . Tampon : Formate de Na 0.001 M , pH 3.6 . Gradient linéaire en NaCl de 0 à 0.6 M . Volume total 1600 ml . Elution des peptides restant sur la colonne avec NaCl 1 M .

FIGURE 10

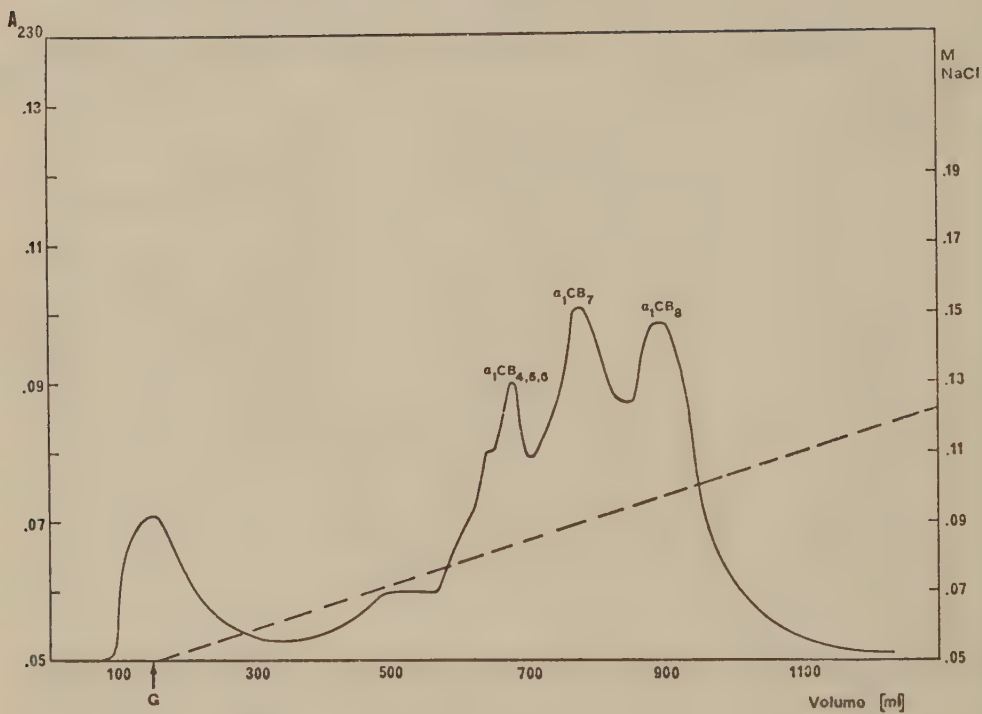


Figure 10 : Peptides élués de la colonne de phosphocellulose avec 1 M NaCl, en rechromatographie sur une colonne de CM cellulose.

Tampon : formate de Na 0.01 M pH 3.4 . Gradient linéaire de 0.05 à 0.15 M en NaCl. Volume total : 1600 ml.

FIGURE 11

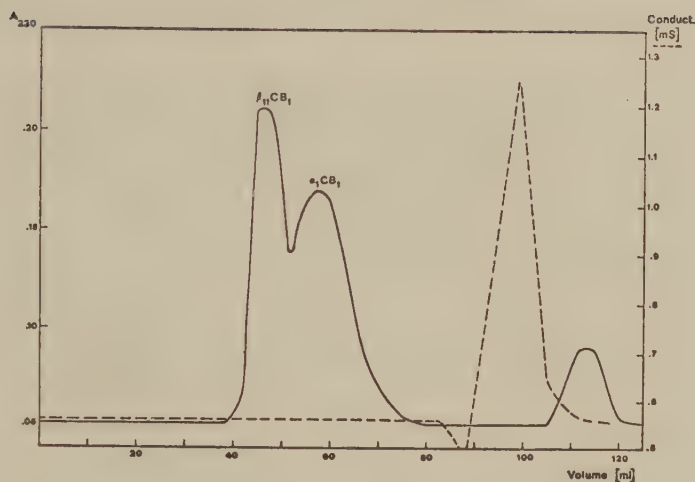
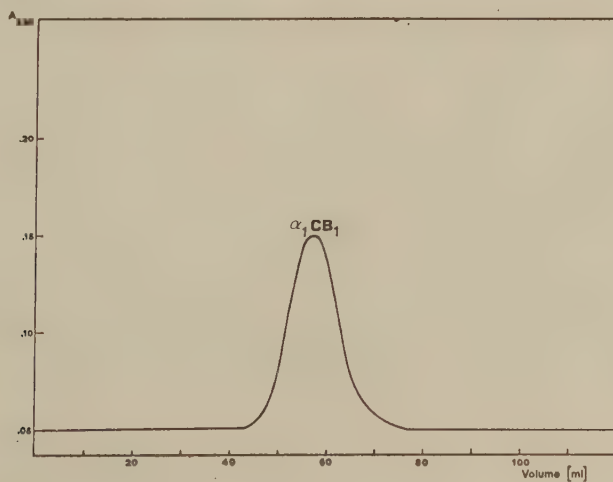


Figure 11: Dessalage du pic contenant  $\alpha_1\text{CB}_1$  et  $\beta_{11}\text{CB}_1$  issus de la colonne de phosphocellulose. Colonne de Sephadex G 15<sup>1</sup>. Tampon d'éluion : acétate d'ammonium 0.1M pH 4.

Figure 12 : Rechromatographie de la fraction  $\alpha_1\text{CB}_1$  de la figure 11 sur une colonne de Sephadex G15. Tampon : Acétate d'ammonium  $\alpha_1\text{CB}_1$ , 0.1M, pH 4.

FIGURE 12



La chromatographie sur colonne de phosphocellulose permet d'obtenir sous une forme pure , après dessalage sur G 15 dans l'acétate d'ammonium 0.1M ,PH 4 , les peptides  $\alpha_1\text{CB}_2$  et  $\alpha_1\text{CB}_3$  .

Le peptide  $\alpha_1\text{CB}_1$  qui est élué dans le premier pic de phosphocellulose n'est pas pur et , il peut être séparé de son contaminant , probablement  $\beta_{11}\text{CB}_1$  , lors du dessalage sur Sephadex G 15. Sur cette colonne , il est élué dans le volume inclu , alors que le peptide contaminant est dans la phase exclue. La pureté des peptides  $\alpha_1\text{CB}_3$  et  $\alpha_1\text{CB}_2$  a été vérifiée sur gel-gradient de 10 à 18 % . Le peptide  $\alpha_1\text{CB}_1$  n'a jamais pu être détecté sur gel -gradient d'acrylamide. Il a été rechromatographié sur G 15 et la symétrie du pic obtenu nous a permis de conclure à un degré de pureté suffisant. Les figures 11 et 12 montrent le schéma d'éluion de ce peptide de la colonne de Sephadex G15 et la séparation du pic contaminant.

Les peptides restant sur la colonne , c'est à dire  $\alpha_1 - (\text{CB}_4, \text{CB}_5, \text{CB}_6, \text{CB}_8, \text{CB}_7)$  sont rechromatographiés séparément sur CM cellulose et dessalés sur G 15. On a ainsi pu purifier au moins partiellement les peptides  $\text{CB}_7$  et  $\text{CB}_8$ . L'obtention des peptides  $\text{CB}_4$ ,  $\text{CB}_5$  et  $\text{CB}_6$  sous une forme totalement pure aurait nécessité l'utilisation d'autres méthodes de séparation. Considérant la parfaite homologie des peptides purifiés avec les peptides correspondants d'autres collagènes de même type , une séparation et une analyse plus poussée n'ont pas été jugées nécessaires.

La composition en acides aminés de cinq peptides différents , isolés à partir de la chaîne  $\alpha_1$  du collagène de veine est donnée en table 3 .

En parallèle sont aussi cités les résultats trouvés dans la littérature pour la peau de veau ( 61 ) et la peau de babouin. ( 18 ). Parmi ces peptides , c'est  $\alpha_1\text{CB}_1$  qui est sujet au plus grand nombre de variations d'une espèce à l'autre. Ainsi , le peptide  $\alpha_1\text{CB}_1$  de peau de veau contient quatre acides aminés additionnels par rapport à celui de peau de rat et il a le même nombre de résidus que les peptides  $\alpha_1 (\text{CB}_0 + \text{CB}_1)$  du collagène de tendon de queue de rat. D'autre part , les collagènes de peau de poulet et de lapin ont une méthionine en deuxième position , comme le collagène de tendon de queue de rat d'ailleurs , et cette méthionine , lors du clivage au CNBr , donne naissance à un dipeptide terminal  $\text{CB}_0$ . Ce  $\text{CB}_0$  , par contre,est absent des collagènes de peau de veau , de babouin et d'homme car , dans ces trois collagènes , la méthionine en deuxième position est remplacée par une leucine. Ceci semble être aussi le cas pour le collagène de veine de veau , car il contient une leucine dans sa composition.

Les collagènes ayant une méthionine en deuxième position n'ont pas de leucine dans leur peptide N- terminal.

D'après ces résultats , on peut conclure que le peptide  $\alpha_1 \text{CB}_1$  du collagène de veine de veau est très semblable au  $\alpha_1 \text{CB}_1$  du collagène de peau de veau , de peau de babouin et de peau humaine. ( 4 )

Les compositions en acides aminés des peptides  $\text{CB}_2$  et  $\text{CB}_3$  ont été calculées à partir de trois analyses séparées et sont en accord avec les valeurs trouvées pour ces peptides dans d'autres collagènes. Le peptide  $\alpha_1 \text{CB}_2$  se distingue surtout par son contenu élevé en imino-acides , proline et hydroxyproline et son poids moléculaire faible : 3200.

Le peptide  $\alpha_1 \text{CB}_3$  , seul peptide ayant un poids moléculaire d'environ 13.000 , se distingue par son contenu élevé en acide glutamique. Dans le cas du collagène de veine , le nombre de résidus glutamique est légèrement inférieur à celui qui est habituellement trouvé.

Pour les peptides  $\text{CB}_7$  et  $\text{CB}_8$  , la composition en acides aminés donnée en table 3 résulte d'une seule analyse . Elle correspond cependant assez bien à celle publiée dans la littérature pour le collagène de peau de veau. Une seule différence importante réside dans le degré d'hydroxylation de la proline qui , surtout dans le cas du peptide  $\text{CB}_7$  , est nettement supérieur à la normale . On détecte 35 Hyp au lieu de 20 pour la peau de veau , et de 26 pour la peau de babouin.

TABLE 3

Composition en acides aminés de cinq peptides clivés par CNBr à partir de la chaîne  $\alpha_1$  du collagène de veine de veau et comparaison avec des peptides d'autres collagènes déjà connus.

|                    | CB <sub>1</sub>       |              | CB <sub>2</sub> |              | CB <sub>3</sub> |              | CB <sub>7</sub> |              | CB <sub>8</sub> |              |
|--------------------|-----------------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|
|                    | veine saphène de veau | Peau de veau | Veine de veau   | Peau de veau | veine de veau   | peau de veau | veine de veau   | peau de veau | veine de veau   | peau de veau |
| 4 Hyp              | 0                     | 0            | 6(6.1)          | 5            | 13.3            | 15           | 35              | 20           | 31              | 27           |
| Asx                | 1(1.1)                | 1            | 1(0.6)          | 0            | 6               | 7            | 13              | 13           | 11              | 10           |
| Thr                | 1(0.9)                | 1            | 0               | 0            | 1(0.6)          | 0            | 5(4.7)          | 5            | 5               | 6            |
| Ser                | 3(2.8)                | 3            | 2(2.2)          | 2            | 3(2.8)          | 3            | 8(7.9)          | 7            | 8               | 9            |
| Glx                | 2(2.1)                | 2            | 4(3.8)          | 4            | 13              | 16           | 20              | 17           | 21              | 20           |
| Pro                | 2                     | 2            | 6(5.8)          | 7            | 14              | 14           | 36              | 40           | 33              | 32           |
| Gly                | 4(3.7)                | 3            | 12              | 12           | 46              | 50           | 86              | 89           | 90              | 91           |
| Ala                | 2(0.4)                | 0            | 2               | 2            | 21              | 22           | 31              | 37           | 36              | 36           |
| Val                | 1(0.9)                | 1            | 0               | 0            | 3               | 4            | 4               | 6            | 4               | 5            |
| Ile                | 1                     | 1            | 0               | 0            | 0               | 0            | 2               | 3            | 2               | 2            |
| Leu                | 1                     | 1            | 1               | 1            | 0               | 3            | 5               | 4            | 5               | 4            |
| Tyr                | 1                     | 2            | 0               | 0            | 0               | 0            | 0               | 0            | 0               | 0            |
| Phe                | 0                     | 0            | 1               | 1            | 3(2.8)          | 3            | 3               | 3            | 3               | 3            |
| HyI                | 0                     | 0            | 0               | 0            | 0.22            | 0            | 1.25            | 1            | 1.18            | 1            |
| His                | 0                     | 0            | 0(0.2)          | 0            | 0               | 0            | 0               | 0            | 0               | 0            |
| Lys                | 1(1.2)                | 1            | 0               | 0            | 4.71            | 5            | 9.6             | 10           | 9.02            | 9            |
| Arg                | 0                     | 0            | 1               | 1            | 6               | 6            | 14              | 13           | 14              | 15           |
| Homo-ser + lactone | 1                     | 1            | 1               | 1            | 1               | 1            | 1               | 1            | 1               | 1            |
| Total              | 19                    | 19           | 37              | 36           | 138             | 149          | 274             | 269          | 275             | 271          |
|                    |                       |              |                 |              |                 |              | 274             | 274          |                 | 263          |

#### 4. Conclusions.

Grâce à notre méthode de solubilisation , nous avons réussi à obtenir une quantité importante du collagène de veine de veau sous forme native intacte. Une telle proportion de matériel soluble , obtenue sans utilisation d'enzymes protéolytiques , pepsine parexemple , est exceptionnelle.

Ce collagène a été caractérisé par différentes méthodes , et tous les résultats tendent à prouver que la molécule est bien du collagène soluble intact , consistant essentiellement en type I. Il faut noter que l'obtention d'un collagène ayant ses extrémités intactes est peu fréquente. Aussi bien la composition en acides aminés que les profils de séparation des chaînes sur colonne de CM cellulose et sur gel SDS , comme aussi l'image de résolution des peptides CNBr , sont comparables aux résultats obtenus avec d'autres collagènes de type I.

Cependant une différence notable concerne les unités saccharidiques. Le collagène isolé à partir de veine saphène de veau contient un pourcentage plus élevé de glucose et de galactose que celui habituellement trouvé pour le type I. D'autre part , la découverte du xylose comme unité saccharidique faisant partie intégrante de la molécule de collagène est aussi un résultat intéressant. ( 83) Le xylose est toujours inséré sur une protéine au niveau d'une sérine ou d'une thréonine ; il serait donc intéressant de détecter et d'isoler le ou les peptides contenant ce sucre. Peut-être est-il attaché plutôt à la chaîne  $\alpha_2$  qui contient une quantité de sérine nettement plus élevée que celle habituellement reconnue ?

En ce qui concerne la partie purement protéique , il n'y a pas de différences vraiment significatives entre le collagène de type I isolé à partir de veines saphènes de veau et celui de même type extrait de peau ou d'autres tissus.

Notre méthode est toutefois limitée parce qu'elle ne permet d'étudier que le 16 % du collagène total de la veine. Pour avoir une vue d'ensemble du collagène de veine , nous avons entrepris , sur le résidu d'extraction de tissu, qui contient encore le 84 % du collagène , une solubilisation ayant recours , cette fois , à la pepsine .

## B .COLLAGENE SOLUBILISE A L'AIDE DE LA PEPSINE .

### 1. Solubilisation du collagène de veines saphènes à l'aide de la pepsine.

#### 1.1. Introduction.

Remarque : Le matériel étudié dans cette deuxième partie est celui qui est resté après les différentes extractions déjà décrites , par le citrate et l'acide acétique.

La solubilisation du collagène par la pepsine est une méthode classique, étant donné que , dans de nombreux cas , c'est la seule façon d'obtenir du collagène en quantités assez importantes pour permettre des études physico-chimiques.

Cette méthode a été utilisée avec succès par R.L. Trelstad pour le collagène d'aorte humaine ( 79 ) , moins de 1 % de collagène ayant pu être solubilisé avant utilisation d'enzyme. L'action de la pepsine sur le collagène commence à être bien connue. Il est admis que la pepsine n'altère pas la structure en triple hélice , ni ne coupe la molécule de collagène sauf à ses extrémités N et C-terminales. ( 16, 32 ) . La structure en triple-hélice du collagène lui confère donc une résistance élevée à la protéolyse par la pepsine ( 59 ) .

Le collagène soluble par la méthode non dégradative étant constitué uniquement de type I , nous avons appliqué la pepsine sur le reste tissulaire insoluble dans le but de trouver un ou plusieurs autres types de collagène dans la veine. Ainsi le type III n'a jamais pu être solubilisé sans le recours à la pepsine , sauf s'il provenait de tissus embryonnaires. Etant donnée l'existence du type III dans l'aorte et les artères en général , il est fort probable qu'il soit aussi un constituant de la paroi veineuse.

#### 1.2. Matériel et méthodes.

##### 1.2.1. Méthode de solubilisation.

La méthode de solubilisation adoptée est celle préconisée par Trelstad pour les collagènes d'aorte humaine (79) . Le résidu est mis en suspension

dans de l'acide acétique 0.5 M . La pepsine ( Worthington Bioch. Corp. 2 X cristallisé ) jusqu'à une concentration de 20 mg par gramme de résidu. La digestion enzymatique se fait à 4 degrés C . sous agitation , pendant 48 heures. L'extrait clarifié est neutralisé par NaOH pour inactiver la pepsine. Le collagène est ensuite précipité par addition de NaCl jusqu'à une concentration finale de 20 % , puis remis en solution et précipité une deuxième fois. Le précipité final est transféré dans de l'acide acétique 0.5 M . Après dialyse contre de l'acide acétique 0.1 % , il est lyophilisé.

### 1.2.2. Composition en acides aminés et séparation des chaînes sur colonne de CM cellulose.

Méthodes utilisées : les mêmes que celles déjà décrites dans le chapitre concernant le collagène soluble.

### 1.3. Résultats et discussion.

#### 1.3.1. % de solubilisation.

Cette méthode de solubilisation s'est révélée très concluante , le 90 % du collagène restant dans le résidu après les diverses extractions par le citrate et l'acide acétique , a passé en solution . Ce rendement est particulièrement élevé , si on le compare à celui obtenu par Irelstad sur le collagène d'aorte humaine ( 79 ) . Selon cet auteur , le 15 % seulement du collagène est solubilisé dans une première extraction pepsique et , 15 % additionnels sont obtenus lors d'une deuxième "pepsinisation" .

#### 1.3.2. Composition en acides aminés et séparation des chaînes sur CM cellulose .

Une caractérisation sommaire du collagène extrait par la pepsine a été faite. La composition en acides aminés ( table 4 ) et la séparation des chaînes sur CM cellulose ( Figure 13 ) , de même qu'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 6 % en présence de SDS ont vérifié que tous les produits recueillis étaient de type collagénique. Toutefois la présence de CYs et celle d'un matériel additionnel dans la région du pic  $\beta_{12}$  sur CM cellulose ( voir figure 13 ) étaient de bons indices d'une hétérogénéité des types de collagène en présence.

Si on compare les résultats de composition en acides aminés avec ceux donnés par Trelstad ( 79 ) pour le collagène de type III d'aorte , et par Fujii (23 ) pour le collagène de type III de peau foetale , on peut estimer que le matériel solubilisé contient une proportion assez grande de type III. Le type III se caractérise , en effet , par la présence de Cys et par un contenu généralement plus élevé en glycine et en hydroxyproline, plus faible en valine et phénylalanine que dans le type I.

Pour analyser plus précisément ce matériel , des précipitations fractionnées ont été effectuées en vue d'isoler et de doser les différents collagènes en présence.

## 2. Précipitation fractionnée du collagène extrait par la pepsine. Quelques caractérisations de ces fractions.

### 2.1. Introduction.

Ce fractionnement a été conduit selon la méthode de Trelstad ( 80 ). Les molécules de collagène étant de longs cylindres relativement rigides ayant tendance à réagir mutuellement et à former des agrégats , elles ne peuvent être dissociées en utilisant simplement des séparations chromatographiques . Comme des différences de solubilité existent entre les différents collagènes, l'utilisation de précipitation fractionnée est donc une méthode efficace.

### 2.2. Matériel et méthodes.

#### 2.2.1. Technique de fractionnement.

Le résidu solubilisé à l'aide de la pepsine , après précipitation , dialyse et lyophilisation est redissous à 4 degrés C dans un tampon phosphate de potassium 0.16 M , à pH 7.6 . La concentration est d'environ 1 mg/ ml. Après une solubilisation d'environ 24 heures sous agitation , la solution est centrifugée à 34.000 rpm pendant 2 heures , puis soumise à la précipitation fractionnée. La précipitation peut se faire soit en ajoutant à la solution des concentrations croissantes de NaCl , soit en dialysant la solution contre une succession de tampons phosphate de K 0.16 M , pH 7.6 contenant des concentrations croissantes en NaCl.

FIGURE 13

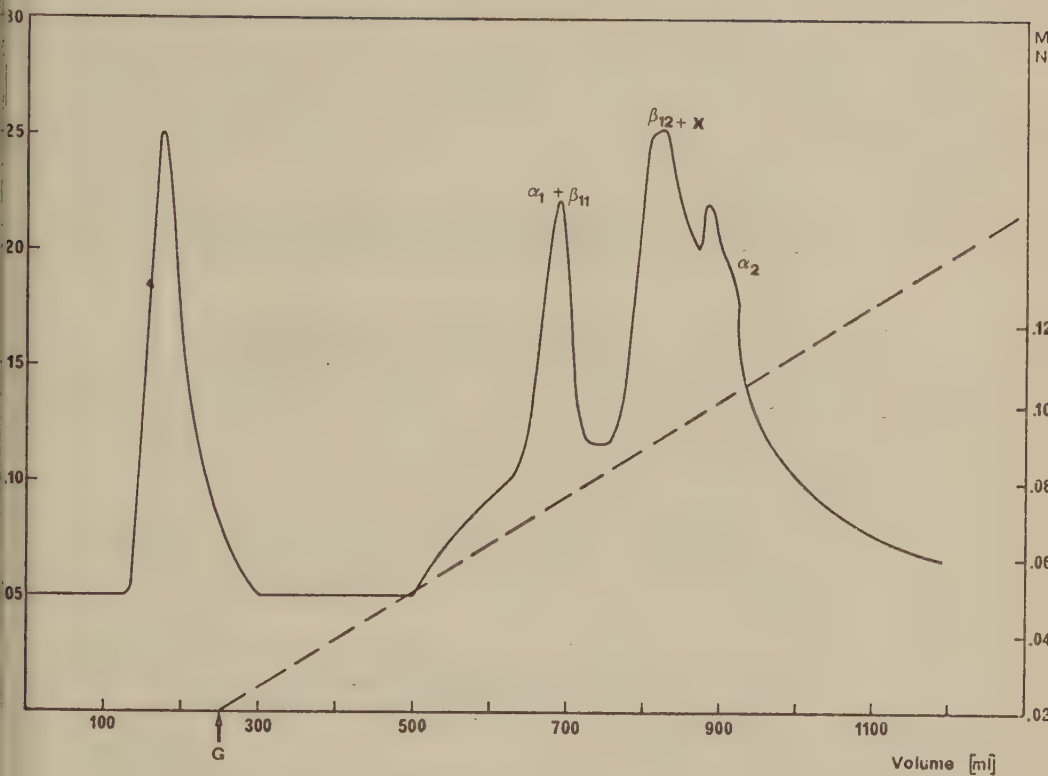


Figure 13 : Séparation sur colonne de CM cellulose du collagène de l'extrait peptique total. Tampon : acétate de sodium, 0.06 M, pH 4.8 + 0.02 M en NaCl, + 1M urée. Gradient linéaire en NaCl de 0.02 M à 0.12 M, sur un volume total de 800 ml.

TABLE 4

|       | Collagène de veines saphènes de veau |           |          |           |                                        |                                                | Type III<br>peau de<br>veau de<br>2 mois (76) | Type III<br>aorte(79) | Type III<br>peau de<br>veau de<br>2 mois (76) |
|-------|--------------------------------------|-----------|----------|-----------|----------------------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------|-----------------------------------------------|
|       | extrait<br>pepsique<br>total         | L.5M NaCl | 2:4MNaCl | 3.4M NaCl | soluble<br>dans<br>l'acide<br>acétique | Type III<br>peau de<br>veau foe-<br>tale. (23) |                                               |                       |                                               |
| 4 Hyp | 108                                  | 112       | 85       | 27        | 94                                     | 107                                            | 112                                           | 114                   |                                               |
| Asx   | 45                                   | 44        | 44       | 20        | 49                                     | 57                                             | 45                                            | 50                    |                                               |
| Thr   | 17                                   | 16        | 20       | 16        | 20                                     | 16                                             | 16                                            | 17                    |                                               |
| Ser   | 35                                   | 36        | 37       | 35        | 40                                     | 45                                             | 33                                            | 59                    |                                               |
| Glx   | 71                                   | 72        | 73       | 42        | 83                                     | 79                                             | 78                                            | 76                    |                                               |
| Pro   | 115                                  | 113       | 114      | 114       | 113                                    | 112                                            | 95                                            | 113                   |                                               |
| Gly   | 340                                  | 347       | 314      | 290       | 316                                    | 339                                            | 350                                           | 334                   |                                               |
| Ala   | 111                                  | 102       | 121      | 198       | 115                                    | 87                                             | 78                                            | 88                    |                                               |
| Cys   | 3                                    | 3         | --       | traces    | ---                                    | 5                                              | 2                                             | 2                     |                                               |
| Val   | 23                                   | 17        | 35       | 116       | 21                                     | 19                                             | 21                                            | 16                    |                                               |
| Met   | 6                                    | 6         | 5        | 2         | 4.6                                    | 6                                              | 11                                            | 8                     |                                               |
| Ile   | 11                                   | 11        | 14       | 17        | 14                                     | 14                                             | 20                                            | 14                    |                                               |
| Leu   | 24                                   | 22        | 31       | 37        | 30                                     | 15                                             | 33                                            | 21                    |                                               |
| Tyr   | 4                                    | 3         | 5        | 14        | 6                                      | 4                                              | 6                                             | 2                     |                                               |
| Phe   | 14                                   | 12        | 20       | 34        | 15                                     | 9                                              | 15                                            | 11                    |                                               |
| Hyl   | 6                                    | 6         | 8        | 2         | 6                                      | 5                                              | 14                                            | 6                     |                                               |
| Lys   | 23                                   | 25        | 25       | 11        | 30                                     | 28                                             | 21                                            | 27                    |                                               |
| His   | 5                                    | 6         | 7        | 5         | 6                                      | 8                                              | 7                                             | 7                     |                                               |
| Arg   | 44                                   | 46        | 43       | 9.7       | 50                                     | 44                                             | 40                                            | 44                    |                                               |

La dialyse s'est révélée plus efficace. C'est la méthode qui a été adoptée. Le type III précipite normalement à 1.5 M en NaCl et le type I à 2.4 M. Un autre matériel précipite entre 3.4 et 4 M. Ces deux dernières précipitations fractionnées permettent d'isoler le collagène de membrane basale, ou des trimères de  $\alpha_1$ , ou encore des chaînes migrant entre les  $\alpha$  et les  $\beta$  et dont la caractérisation et l'organisation moléculaire viennent d'être élucidées par Rhodes et Miller ( 64 ). Chaque précipité après dialyse de 24 heures contre un tampon phosphate 0.16 M à une concentration adéquate en NaCl, c.à.d. soit 1.5 M, 2.4 M, 3.4 M ou 4 M, est récolté par centrifugation à 34.000 rpm. Puis, il est redissous dans l'acide acétique 0.5 M et dialysé contre l'eau et lyophilisé.

## 2.2.2. Composition en acides aminés, migration électrophorétique sur gel de polyacrylamide 6 % en présence de SDS, peptides au CNBr et leur migration sur gel.

Ces méthodes ont déjà toutes été décrites dans le chapitre concernant le collagène soluble dans le citrate ou dans l'acide acétique.

## 2.2.3. Electrophorèse interrompue sur gel de polyacrylamide.

Le recours à une technique complémentaire s'est imposé afin de séparer la chaîne  $\alpha_1$ (III) de la chaîne  $\alpha_1$ (I). Ces 2 chaînes migrent exactement au même endroit si le matériel est réduit avant d'être appliqué sur le gel. De plus, si on ne met pas d'agent réducteur, le type III migre uniquement sous forme de  $\gamma$  ou d'agré-gats de haut poids moléculaire. Pour séparer ces deux chaînes, la technique d'électrophorèse " interrompue " sur gel de polyacrylamide préconisée par Sykes ( 77 ) a été adoptée, avec quelques modifications.

La préparation du gel de 6 % en acrylamide, et du stacking gel de 3 %, a déjà été décrite. Le tampon dans lequel l'échantillon est dissous est celui décrit par Laemmli ( 42 ), mais sans mercaptoéthanol. Le tampon aux électrodes est composé de 0.025 M Tris, 0.192 M Gly, et 0.1 % SDS. Ces tampons sont ceux utilisés par Laemmli et sont différents de ceux utilisés par Sykes ( 72 ). Les échantillons dissous dans le tampon sont chauffés pendant 1 à 2 minutes à 90 degrés C avant leur transfert dans les différents puits. On maintient l'électrophorèse jusqu'à ce que le bleu de bromophénol ait migré de 0.5 cm, puis on coupe le courant et remplit les puits avec du DTT 10 %, remplaçant le mercaptoéthanol préconisé par Sykes. On laisse diffuser l'agent réducteur dans le gel pendant une heure. Le DTT a été préféré au mercaptoéthanol en raison de l'odeur désagréable de ce dernier.

Après arrêt d'une heure , on remet l'électrophorèse en marche et on prolonge la migration jusqu'à ce que le bleu de bromophénol ait atteint le bas du gel. La coloration et la décoloration se font selon les méthodes déjà décrites.

Les gels colorés sont " scannés " à 560 nm grâce un spectrophotomètre équipé d'un transporteur linéaire. La détermination de la surface de chaque pic a été faite à l'aide d'un planimètre . Le principe de cette technique est illustré dans la figure 14 ( d'après Sykes ( 77 ) ) .

FIGURE 14

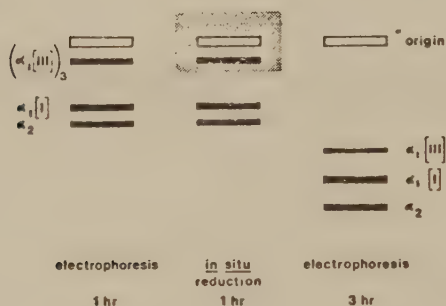


Figure 14 : Principe de l'électrophorèse interrompue.

## 2.3. Résultats et discussion.

### 2.3.1. Rendement des différents précipités.

7 g de collagène extrait à la pepsine sont redissous dans le tampon phosphate 0.16 M , pH 7.5.

875 mg ne passent pas en solution.

Dans la fraction soluble , 4 g précipitent à une concentration en NaCl de 1.5 M , et 1.75 g à 2.4 M .

0.15 et 0.1 g précipitent à 3.4 et à 4 M respectivement.

D'après une première estimation , en se fiant uniquement à la précipitation fractionnée pour doser les différents types de collagène présents dans l'extrait pepsique , on pourrait estimer que cet extrait contient 57 % de type III correspondant au matériel précipitant à 1.5 M.

Mais il faut d'abord vérifier si tout le matériel retrouvé dans cette fraction correspond réellement au type III, Car, d'après Epstein et Munderloh ( 21 ), la méthode de précipitation fractionnée n'est pas assez reproductible pour déterminer exactement les types de collagène. Elle permet d'enrichir chaque fraction en un type donné, mais pas de faire une véritable séparation. Une analyse plus approfondie de ces fractions est donc nécessaire.

### 2.3.2. Analyse des acides aminés des différentes fractions.

Cette analyse est résumée à la table 4.

On remarque que la fraction obtenue à 1.5 M en NaCl est nettement enrichie en type III. Le contenu élevé en Hyp et en Gly, la présence de Cys, le contenu relativement faible en Val et Ala, en sont autant d'indices.

Mais les valeurs trouvées pour l'alanine par exemple sont encore trop élevées pour que l'on soit en présence du type III pur. Quant à la fraction précipitant à 2.4 M, les résultats sont assez comparables avec ceux donnés pour le collagène de type I extrait dans l'acide acétique. Les différences constatées, c.à.d. un surcroît de Val et Ala et un déficit d'Arg et Glx ne sont pas explicables par une contamination en type III. Il semble que ce type ait déjà précipité entièrement dans la fraction formée à 1.5 M. Notre fraction ci-dessus contiendrait donc un mélange de type I et III, tandis que celle déposée à 2.4 M contiendrait du type I contaminé par une faible quantité d'un autre matériel, qui n'est pas du type III. Quant au matériel demeuré en solution après les deux premiers fractionnements et qui précipite à 3.4 M, il n'est pas identifiable avec aucun des types mentionnés. Sa composition en acides aminés présente une ressemblance troublante avec celle de l'élastine. Ce matériel pourrait correspondre au composant dénommé elastin-like " de Irelstad ( 79 ). Cette protéine "elastin-like" possède une solubilité analogue à notre précipité formé à 3.4 M et elle a aussi un faible contenu en acides aminés acides ou basiques et beaucoup d'acides aminés neutres, spécialement Gly, Ala, et Val. Elle contient aussi des demi-cystines. Par contre cette protéine de Irelstad a un poids moléculaire inférieur à celui des chaînes, ce qui n'est pas le cas pour notre précipité.

### 2.3.3. Gel de polyacrylamide 6 % avec SDS des différentes fractions obtenues.

Ces gels 6 % ont été fabriqués en vue de séparer les différentes chaînes

du collagène. Les échantillons sont dissous dans un tampon contenant du mercapto-éthanol. Le type III, dans ces conditions, devrait migrer sous forme de chaîne  $\alpha$ . Il est connu, en effet, que les trois chaînes composant la molécule  $\alpha_1(\text{III})$  sont maintenues ensemble par des ponts disulfures contenus dans la partie C terminale des chaînes et qu'elles résistent à l'hydrolyse pepsique. ( 69 ) Les résultats de cette migration électrophorétique sont donnés dans la figure 15

FIGURE 15

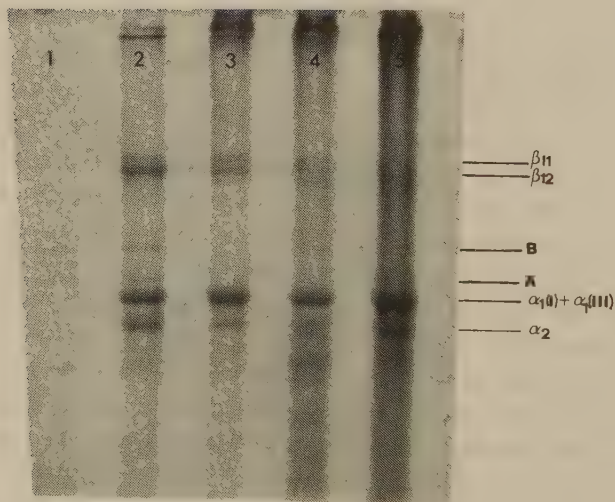


Figure 15 : Gel de polyacrylamide 6 % avec SDS, séparation des différentes fractions pepsiques de veines saphènes normales de veau.

- 1) Matériel précipitant à 3.4 M
- 2) Matériel précipitant à 2.4 M
- 3) Matériel précipitant à 1.5 M
- 4) Matériel ne se redissolvant pas dans le tampon phosphate, pH 7.6
- 5) Extrait pepsique total.

Si on compare les diagrammes de collagène extrait par la pepsine avec ceux du collagène extrait dans l'acide acétique 0.5 M, on remarque une proportion nettement plus élevée de polymères de haut poids moléculaire et une diminution nette du matériel migrant dans la région des  $\beta$ . (voir figure 6 de la section 3.2.2.) Pour le collagène extrait dans l'acide acétique, on avait les proportions suivantes : 26.5 % de  $\gamma$  et de composés de haut poids moléculaire, 37.6 % de  $\beta$ , et 35.8 % de  $\alpha$ . Pour le collagène extrait par la pepsine, on obtient : 53.4 % de  $\gamma$  et de composés de haut poids moléculaire, 6.9 % de  $\beta$ , et 32.6 % de  $\alpha$ .

On peut déduire de ces résultats que la quasi totalité du collagène de type III migre sous forme d'entités  $\gamma$  ou d'agrégats de haut poids moléculaire, et peut-être aussi sous forme  $\alpha$ , mais la chaîne  $\alpha_1(I)$  n'est pas séparée de la chaîne  $\alpha_1(III)$ .

Le % élevé de polymères de haut poids moléculaire indique soit que la réaction au mercaptoéthanol n'a pas été entièrement efficace - elle est effectivement facilement réversible si elle n'est pas suivie d'une carboxyméthylation et de l'exclusion totale d'air, d'oxygène ou d'oxydants -, soit la présence d'autres cross-links que les ponts disulfures.

La fraction non-redissoute dans le tampon phosphate semble contenir une majorité si ce n'est la totalité de collagène de type III. Elle ne présente effectivement qu'une quantité minime d'  $\alpha_2$ , un % de  $\beta$  négligeable, et le matériel migrant dans la région de  $\alpha_1$  permet de suspecter la présence du type III.

La fraction précipitée à 1.5 M en NaCl contient un mélange de types I et III. Dans le matériel précipité à 2.4 M, il y a nettement prédominance du type I et la composition en acides aminés, la présence de chaînes  $\beta$  en quantités plus importantes, la diminution des agrégats de haut poids moléculaire excluent la présence du type III. Les % des différents constituants de la fraction précipitée à 2.4 M sont les suivants : 36.9 % d'agrégats de haut poids moléculaire, 23.8 % de  $\beta$ , et 30 % de  $\alpha$ . En plus du collagène de type I, il y a dans cette fraction présence de deux autres constituants migrant entre les  $\alpha$  et les  $\beta$ , et représentant un total de 9 % (4 % pour la protéine migrant à proximité des  $\beta$ , et 5 % pour celle migrant le plus près des  $\alpha$ ).

La fraction précipitant à 3.4 M contient les 2 chaînes migrant entre les positions des  $\alpha$  et des  $\beta$ , outre une autre protéine migrant comme  $\alpha_1$ . Elle contient aussi des peptides de faible poids moléculaire. La caractérisation de ces chaînes reste sujette à caution. Deux d'entre elles, d'après leur migration électrophorétique et leurs propriétés de solubilité, pourraient être homologues ou

identiques aux chaînes  $\alpha A$  et  $\alpha B$  découvertes par Burgeson ( 6 ), dans les membranes basales foetales humaines. Des chaînes analogues ont aussi été découvertes dans les tendons de poulets lathyriques ( 36 ) et dans les membranes synoviales dépourvues de membranes basales. ( 5 ). La présence de ces nouvelles chaînes non encore caractérisées clairement a aussi été notée par Mayne et col. ( 47 ) lors d'une étude de collagène biosynthétisé en cultures de cellules musculaires lisses d'aorte de singe rhésus. Ces chaînes apparaissent dans de nombreux tissus , et ne semblent présentes qu'associées au type III ( 5 ). Elles ne peuvent pas provenir du collagène de membrane basale , puisque leur migration ne change pas en présence d'un agent réducteur. Elles ne peuvent pas non plus être assimilées à un précurseur de chaîne  $\alpha_1$  ou  $\alpha_2$  du collagène de type I , puisqu'elles ont été extraites par la pepsine qui , par définition , coupe les procollagènes en collagènes. ( 44 ) Un éclaircissement sur la nature exacte des chaînes  $\alpha A$  et  $\alpha B$  de Burgeson a été donné très récemment par Rhodes et Miller ( 64 ) . Ces deux auteurs ont isolé ces chaînes et ont montré qu'elles existent sous la forme de deux espèces moléculaires ayant la composition de  $(A)_3$  et  $(B)_3$  . Ils suggèrent d'autre part que ces molécules proviendraient d'éléments structuraux des membranes basales. La proportion relative de ces deux nouveaux collagènes varie selon les tissus . Le collagène dérivé du cartilage , par exemple , est dépourvu de chaîne A , mais contient des quantités significatives de chaîne B.

Pour pouvoir assimiler notre matériel précipité à 3.4 M aux chaînes  $\alpha A$  et  $\alpha B$  de Burgeson , deux vérifications supplémentaires seront nécessaires , à savoir leur comportement migratoire en électrophorèse " interrompue " en présence de DTI et les cartes de leurs peptides CNBr respectifs sur gel-gradient.

#### 2.3.4. Peptides CNBr des différentes fractions.

Les résultats sont exposés à la figure 16.

Les conditions d'électrophorèse sont celles décrites sur gel-gradient de 10 à 18 % . Les peptides caractéristiques du type III sont bien présents dans l'extrait pepsique total et dans le résidu insoluble à pH 7.6 , ainsi que dans le précipité formé à 1.5 M. Dans la fraction à 2.4 M , on ne décèle plus les peptides caractéristiques du type III. Ces résultats confirment donc ceux déjà trouvés par électrophorèse des chaînes entières sur gel à 6 % . Quant à la fraction précipitée à 3.4 M , on constate l'absence totale de peptides dérivés du type III , mais les peptides dérivés du type I sont encore présents. Il faut cependant noter la présence de peptides additionnels , particulièrement dans ceux de faibles poids moléculaires.

Ces peptides sont aussi présents dans la chaîne  $\alpha B$  de Burgeson. ( 6 ). Il n'est pas possible de prouver que ces nouveaux peptides apparaissant lors de la coupure au CNBr de la fraction précipitée à 3.4 M , soient identiques à ceux isolés par Burgeson à partir de la chaîne  $\alpha B$ . Cette fraction précipitée à 3.4 M NaCl présente beaucoup d'analogies avec les chaînes isolées par Burgeson , mais la présence d'impuretés et celle de collagène de type I empêche de les caractériser plus précisément.

FIGURE 16

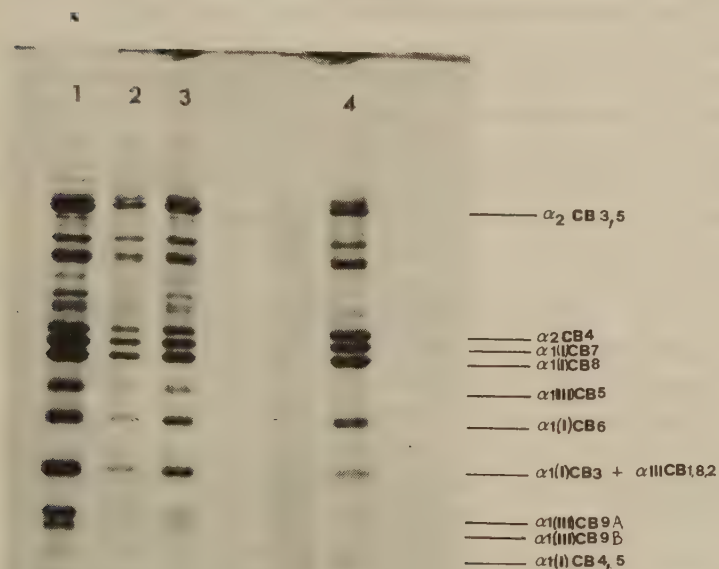


Figure 16: Electrophorèse sur gel gradient d'acrylamide 10 à 18 % des peptides au CNBr provenant des différentes fractions pepsiques de collagène de veines de veau .

- 1) Fraction précipitée à 1.5 M
- 2) Fraction non redissoute dans le tampon phosphate à pH 7.6
- 3) Extrait pepsique total
- 4) Fraction précipitée à 2.4 M.

### 2.3.5. Electrophorèse " interrompue " sur gel à 6 % .

Etant donné que l'électrophorèse sur gel à 6 % effectuée dans les conditions décrites par Laemmli , c.à.d. en dissolvant l'échantillon dans un milieu réducteur , ne permet pas de séparer les chaînes  $\alpha_1(I)$  des chaînes  $\alpha_1(III)$  , la méthode de Sykes a été essayée ( 77 ). Cette méthode s'est révélée concluante car elle permet de séparer nettement les deux chaînes. Les pics ont été enregistrés autour de 560 nm , leur maximum , et une intégration de leur surface gaussienne a été faite. Les résultats de cette expérience sont cités aux figures 17 et 18.

L'estimation de la quantité de type III a été faite en calculant le % d'  $\alpha_1(III)$  sur le total des chaînes .

$$\frac{\alpha_1(III) \times 100}{\alpha_1(I) + \alpha_2 + \alpha_1(III)} = \% \text{ de } \alpha_1(III) \text{ sur le total des } \alpha$$

Ce % ne tient pas compte des autres composants  $\beta$  et de plus haut poids moléculaire. Par cette méthode de calcul , on constate que le collagène de veines saphènes de veau solubilisé à la pepsine contient au moins 29 % de type III , et le précipité à 1.5 M au moins 36 % . Quant au matériel ne se redissolvant pas dans le tampon phosphate à pH 7.6 , il n'a pas été possible de le localiser par la méthode au DTT. Sans gel interrompu , mais avec agent réducteur au départ , il migre dans la région de la chaîne  $\alpha_1$  , comme s'il était constitué en grande partie de type III . Par contre avec la méthode du gel interrompu , on n'observe plus de traces de ce matériel , si ce n'est dans la région des faibles poids moléculaires. Le matériel précipitant à 3.4 M présente une migration inchangée , quelle que soit la méthode utilisée. Ce résultat renforce encore l'analogie entre ces deux chaînes et celles décrites par Burgeson , et avec les deux nouveaux types de collagène analysés par Rhodes. ( 64 ) .

Un point cependant reste obscur : la composition en acides aminés ne concorde pas du tout avec celle publiée par Burgeson ( 6 ) . Il semble que , dans notre cas , ces chaînes soient fortement contaminées par des protéines ou des peptides de petit poids moléculaire , provenant de l'élastine ou de ses produits de dégradation. Il faudrait donc effectuer des purifications ultérieures pour confirmer avec certitude l'équivalence de ces chaînes avec celles de Burgeson ou de Rhodes. Ces chaînes , d'après l'intégration des pics obtenue en mesurant

l'absorption des gels , représentent le 10 % du précipité à 2.4 M et le 50 % en poids du précipité à 3.4 M ce qui constitue environ le 3 % du collagène total extrait par la pepsine.

### 3. Conclusions.

L'extraction du collagène de veines saphènes de veau par la pepsine nous a donc permis d'obtenir , sous forme soluble , le 90 % du collagène restant dans le résidu tissulaire. Une analyse de ce collagène nous a montré que , contrairement au collagène soluble dans le citrate ou l'acide acétique , il n'était pas constitué par un matériel homogène. En effet , bien que le type I soit encore le plus abondant , il faut noter la présence de type III en quantités importantes. La présence du type III a d'abord été démontrée dans la peau humaine ( 52 ). Dans certains tissus d'organismes foetaux ( 19 ) et dans certaines tumeurs d'origine musculaire lisse , ( 8 ) il est présent en très grandes quantités. Chez les organismes adultes , la plus grande proportion de type III a été découverte dans la paroi artérielle et dans l'aorte ( 62 ) . Il n'est donc pas étonnant de trouver également dans la veine une grande proportion de type III. Cette fraction représenterait , d'après nos résultats , le 29 % du collagène extrait à la pepsine. Ce chiffre est plutôt à prendre comme une estimation minimale de la quantité de type III. Nous n'avons , en effet , pris en considération que les chaînes  $\alpha$  pour cette détermination. Or , il y a aussi du matériel de type III , en quantités importantes , migrant dans la région des  $\beta$  et des hauts poids moléculaires, même en présence d'agent réducteur. Cette présence de chaînes  $\beta$  , même après traitement au DTT , indique que la pepsine n'a pas éliminé complètement les régions terminales possédant les cross-links intra et inter-moléculaires liant les différentes chaînes . L'existence d'agrégats de hauts poids moléculaires démontre aussi que des cross-links subsistent dans la fraction protéique après traitement à la pepsine. Cette même constatation a été faite sur du collagène de type III de valve cardiaque de porc traité à la pepsine. ( 46 )

La détermination exacte de la proportion de type III migrant dans les régions des  $\beta$  et des hauts poids moléculaires n'est pas possible , par défaut de séparation d'avec le type I. Il faudrait séparer le type III quantitativement pour donner les proportions exactes de type I et III.

Une autre méthode a d'ailleurs été testée dans ce but , celle proposée par Chandra-  
rajan ( 7 ). Elle tient compte de différences dans les caractéristiques de déna-  
turation et de renaturation des différents types moléculaires. Mais , elle s'est  
révélée aussi peu concluante que la précipitation fractionnée. Il reste toujours  
une contamination importante du type III par le type I.

Une partie du type I pourrait peut-être être liée au type III par certains cross-  
links covalents , ce qui expliquerait sa coprécipitation . Mais , c'est une hypo-  
thèse qui demande encore à être vérifiée.

FIGURE 17

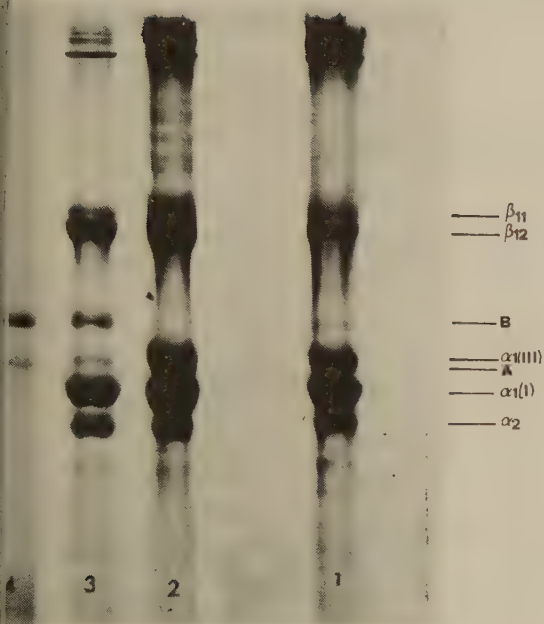
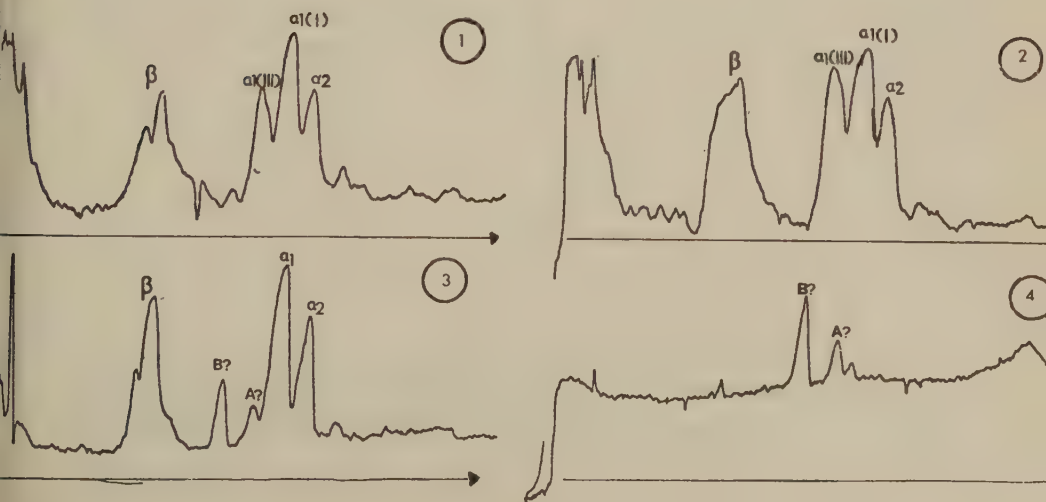


Figure 17 : Electrophorèse interrompue sur gel de polyacrylamide 6 % des différentes fractions pepsiques de veines saphènes de veau .

- 1) Extrait pepsique total
- 2) Fraction précipitée à 1.5 M
- 3) Fraction précipitée à 2.4 M
- 4) Fraction précipitée à 3.4 M

Figure 18 : "Scanning " du gel interrompu de la figure 17. Les différentes fractions sont numérotées de la même manière.

FIGURE 18



C. RENDEMENT GLOBAL DE L'EXTRACTION ET % DES DIFFERENTS TYPES DE COLLAGENES  
DANS LA VEINE SAPHENE DE VEAU.

Rendement global des différentes solubilisations.

|                                              |          |
|----------------------------------------------|----------|
| % de collagène soluble dans le citrate       | : 4.2 %  |
| % de collagène soluble dans l'acide acétique | : 11.7 % |
| % de collagène soluble avec la pepsine       | : 75.7 % |
| <hr/>                                        |          |
| Collagène total solubilisé.                  | : 91.6 % |
| <hr/>                                        |          |

Par la conjugaison des deux méthodes de solubilisation , 91.6 % du collagène de veine saphène de veau ont passé en solution , dont 15.9 % de type I sous forme native , c.à.d. sans coupures des " extensions " terminales.

Proportions des différents types de collagène dans la veine saphène.

| Solubilisé par:  | Type I | Type III | A + B ? |
|------------------|--------|----------|---------|
| Citrate          | 4.2 %  | 0%       | 0%      |
| Acide acétique 1 | 7.5 %  | 0%       | 0%      |
| Acide acétique 2 | 4.2 %  | 0%       | 0%      |
| Pepsine          | 51.5 % | 22 %     | 2.2 %   |
| <hr/>            |        |          |         |
| Totaux           | 67.4 % | 22 %     | 2.2 %   |
| <hr/>            |        |          |         |

On peut conclure que , sur les 91.6 % de collagène extrait par l'utilisation combinée de méthodes non-dégradatives , c.à.d. citrate et acide acétique , et de méthodes hydrolytiques , c'à.d. l'emploi de la pepsine , le

type I représente le 67.4 % , et le type III le 22 % . Quant aux 8 % de collagène restants, on ne peut se prononcer sur son identité de type moléculaire.

L'identification des composants isolés dans le précipité à 3.4 M n'a pas été suffisamment discriminatoire , et on ne peut pas encore dire quelle est leur provenance ni leur type moléculaire. Peut-être font-ils partie des constituants collagéniques de la membrane basale ? Ce collagène de membrane fait d'ailleurs l'objet de nombreuses controverses dans la littérature. A part le type IV proposé par Kéfalides ( 40 ) , d'autres types ont été suggéré. Chung et al ( 10 ) ont trouvé trois types de molécules collagéniques , en diverses combinaisons , dans les membranes basales du foie , du placenta , et des vaisseaux sanguins. Récemment , de nombreux auteurs ont mentionné l'existence de nouvelles chaînes caractérisées par une migration électrophorétique sur gel de polyacrylamide , en présence de SDS , les amenant entre les positions des  $\alpha$  et des  $\beta$  . ( 5,6,36 ) Ces composants sont très solubles et ne précipitent qu'à des concentrations élevées en NaCl . Plusieurs descriptions en ont été faites . Ils ont cependant été à chaque fois préparés à partir de tissus ayant un contenu élevé en membranes basales. Brown et al ( 5 ) ont , par contre , détecté la présence de ces chaînes A et B dans la membrane synoviale , un tissu collagénique dépourvu de membrane basale . D'après Rhodes et Miller ( 64 ) , qui ont démontré l'existence de ces nouvelles chaînes sous deux entités moléculaires distinctes  $(A)_3$  et  $(B)_3$  , ces deux types dériveraient de structures analogues aux membranes basales.

La démonstration de l'hétérogénéité des types moléculaires du collagène de veines est importante , car elle permet une nouvelle approche de l'étude des cas pathologiques. Dans de nombreuses affections du tissu conjonctif, de grandes variations dans les proportions relatives des types I et III sont constatées . Ainsi, dans l'ostéogénèse imparfaite , le type III est présent en quantités trop élevées par rapport à la normale , alors que dans le syndrome d'Ehler-Danlos il y a disparition complète de ce type. ( 56 , 58 ).

### III. COLLAGENE DE VEINES SAPHENES VARIQUEUSES HUMAINES. PRELIMINAIRES.

#### A. COLLAGENE SOLUBLE SANS DIGESTION PAR LA PEPSINE.

##### 1. Préparation du collagène soluble.

##### 1.1. Méthode d'extraction.

La méthode utilisée est la même que celle décrite pour le collagène de veine saphène de veau. Les veines variqueuses sont prélevées lors d'ablation par "stripping", de veines atteintes de varices, sur des individus d'âge moyen 50 ans et de sexe féminin en général.

Les fragments collectés sont lavés puis congelés en abaissant la température à -25 degrés C. Ils sont conservés sous vide dans un dessiccateur et accumulés jusqu'à ce que la quantité soit suffisante pour effectuer l'extraction proprement dite.

##### 1.1.1. Rendement de l'extraction.

| <u>Différentes étapes de l'extraction</u>    | <u>% de collagène extrait</u> |
|----------------------------------------------|-------------------------------|
| lavages à l'acétate                          | 0%                            |
| Extraction au citrate                        | 0.7 %                         |
| Première extraction à l'acide acétique 0.5 M | 2 %                           |
| Deuxième extraction à l'acide acétique 0.5 M | 0.8 %                         |
| <hr/>                                        |                               |
| Collagène total solubilisé.                  | 3.5 %                         |

##### 1.2. Discussion sur l'extraction et le rendement.

Le contenu total en collagène de la veine saphène variqueuse humaine a été estimé par Svejcar à 45.6 + ou- 7 % (74, 75). Pour nos calculs, nous avons retenu la valeur inférieure, étant donné que pour la veine normale de

veau , c'est de % qui a été pris en considération.

Des différences importantes sont à relever lors d'une extraction parallèle de collagènes de veines saphènes de veau et de saphènes variqueuses humaines. Tout d'abord , la moindre solubilité du collagène de veines variqueuses est frappante tout au cours des extractions. Dans le cas des veines de veau , 15.9 % du collagène a passé en solution dans les extractions par le citrate et l'acide acétique , alors que 3.5 % seulement du collagène total des veines variqueuses a été solubilisé par cette méthode. Une autre différence notable est la suivante : lors de l'extraction des veines de veau , le matériel protéique qui passe en solution , soit dans le citrate , soit dans l'acide acétique , après dialyse , consiste presque entièrement en collagène , même avant toute refibrillation. En effet , la composition en acides aminés du matériel solubilisé , après une dialyse exhaustive contre de l'eau distillée , correspond au collagène pour 90 % au moins. Ceci n'est absolument pas le cas pour le matériel extrait des veines saphènes humaines variqueuses, car d'après les analyses d'acides aminés , on peut estimer que le collagène ne représente que le 40 à 50 % du matériel protéique extrait ( voir Table 5 ). La nature exacte du résidu protéique n'a pas été déterminée , mais d'une manière générale , on peut dire qu'il contient un % relativement élevé en Asp , Ser et Glu , la quantité de Ser étant particulièrement importante.

Les résultats de Svejcar , qui avait fait un dosage des constituants de la veine variqueuse par rapport à la veine normale , ont montré que la veine variqueuse contenait moins de collagène et d'élastine , mais davantage de protéoglycans que la veine normale. Ce matériel pourrait-il être identifié à des protéoglycans solubles ? Le % très élevé de Ser paraît le justifier , mais cette hypothèse reste à vérifier.

## 2. Quelques caractérisations du collagène soluble de veines variqueuses.

### 2.1. Analyse des acides aminés .

La méthode utilisée est la même que celle déjà décrite pour le collagène de veines de veau.

#### 2.1.2. Résultats et discussion.

Les résultats de l'analyse des acides aminés du collagène extrait à partir des veines humaines variqueuses figurent à la table 5 . Les compositions en acides aminés ne correspondent pas à celles d'un collagène pur , même après refibrillation. Elles ont déjà été discutées en 1.2. de la page précédente.

## 2.2. Gels de polyacrylamide 6 % en présence de SDS.

### 2.2.1. Matériel et méthodes.

Les mêmes que pour le collagène de veines de veau.

### 2.2.2. Résultats et discussion.

Les résultats obtenus sont donnés par la figure 20.

Des extraits de veines variqueuses obtenus dans le tampon citrate et dans l'acide acétique 0.5 M ont été séparés sur gel de 6 % en acrylamide , en présence de SDS , en parallèle avec les mêmes fractions extraites de veines normales de veau. Contrairement à ce qu'on pouvait attendre de la composition en acides aminés , il n'y a pas de traces de contaminants protéiques importants. L'image de répartition obtenue avec les deux extraits de veines variqueuses est tout à fait comparable à celle de collagène de veines normales. Comment expliquer cette contradiction apparente ? Peut-être , les contaminants sont - ils des protéines ou des peptides de faible poids moléculaire , migrant aussi vite que le bleu de bromophénol , ou extraits du gel ? Ces contaminants pourraient être inaptes à la coloration par le bleu de Coomassie . Ou alors , une faible partie d'entre eux serait des peptides fortement liés au collagène et non- dissociés en présence de SDS . Les chaînes du collagène extrait des veines variqueuses migrent , en effet , un peu moins vite que celles de collagène extrait des veines normales de veau.

## 2.3. Microscopie électronique.

### 2.3.1. Matériel et méthodes.

Les travaux ont été faits au moyen d'un microscope électronique JEM -17 Jeol. Les images de fibres de collagène reconstituées sont des spécimens traités par coloration négative. ( Huxley et Zubay ( 1960 ) ) ( 33 ) . Les cristaux SLS ont été préparés par la méthode de Stark et Kühn (72) et ont été soumis à une double coloration :

- 1) par l'acide phosphotungstique 0.4 % , pH 3.5 et , après lavages à l'eau ,
- 2) par une solution d'acétate d'uranyle non tamponnée.

### 2.3.2. Résultats et discussion.

L'organisation des fibres et le motif périodique du collagène de veines variqueuses est semblable à celui de collagène de veines

TABLE 5

| Nom de l'acide aminé | Matériel extrait dans le citrate avant fibrillation. | Matériel extrait dans l'acide acétique avant fibrillation | Matériel extrait dans l'acide acétique après fibrillation. | Collagène de type I de veines saphènes de veau. |
|----------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| 4 Hyp                | 20                                                   | 40                                                        | 60                                                         | 95                                              |
| Asx                  | 93                                                   | 77                                                        | 58                                                         | 50.6                                            |
| Thr                  | 45                                                   | 40                                                        | 30                                                         | 20.2                                            |
| Ser                  | 90                                                   | 71                                                        | 48                                                         | 39.8                                            |
| Glx                  | 108                                                  | 104                                                       | 87                                                         | 83.4                                            |
| Pro                  | 74                                                   | 81                                                        | 86                                                         | 106                                             |
| Gly                  | 167                                                  | 199                                                       | 261                                                        | 306                                             |
| Ala                  | 75                                                   | 85                                                        | 103                                                        | 112                                             |
| $\frac{1}{2}$ Cys    | 8.4                                                  | 6.7                                                       | traces                                                     | 0                                               |
| Val                  | 43                                                   | 44                                                        | 40                                                         | 24.6                                            |
| Met                  | 9.4                                                  | 10                                                        | 8.8                                                        | 5.4                                             |
| Ile                  | 31                                                   | 29                                                        | 27                                                         | 14.1                                            |
| Leu                  | 76                                                   | 61                                                        | 58                                                         | 30.8                                            |
| Tyr                  | 22                                                   | 20                                                        | 7.8                                                        | 5.7                                             |
| Phe                  | 31                                                   | 26                                                        | 25                                                         | 14.8                                            |
| Hy1                  | 0.2                                                  | 0.4                                                       | 3.9                                                        | 5.9                                             |
| His                  | 19.9                                                 | 16                                                        | 12.8                                                       | 6.1                                             |
| Lys                  | 43                                                   | 40                                                        | 38                                                         | 29.2                                            |
| Arg                  | 42                                                   | 48                                                        | 46                                                         | 50                                              |

Table 5 : Composition en acides aminés du matériel solubilisé dans le citrate, et dans l'acide acétique, avant et après fibrillation. A titre de comparaison, la composition en acides aminés du collagène soluble de veines de veau est aussi notée.

FIGURE 20

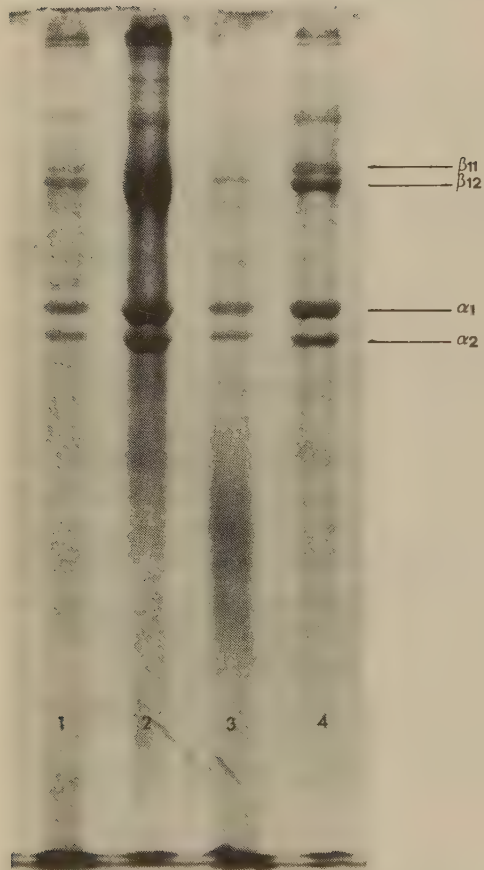
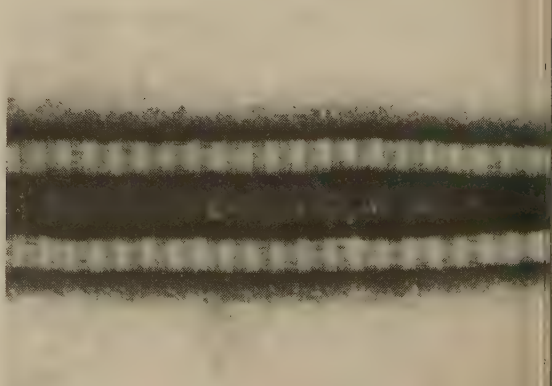


Figure 20 : Electrophorèse sur gel  
de polyacrylamide 6 %  
de collagène extrait par le citrate  
et par l'acide acétique partant  
de veines variqueuses , et compa-  
ré aux mêmes extraits tirés de  
veines de veau.  
1) v. variqueuses , extrait acide  
acétique.  
2) veines de veau extrait acide  
acétique.  
3) veines variqueuses extrait  
citrate.  
4) veines normales de veau , extrai  
citrate.

FIGURE 21

Figure 21:  
Micrographies électroniques  
de fibres de collagène de veines  
variqueuses , après extraction  
par l'acide acétique.



normales de veau. La micrographie d'une fibre de collagène de veines variqueuses est reproduite à la figure 21.

La périodicité des fibres est de 670 à 700 Å.

Un fait intéressant à noter est le diamètre nettement inférieur des fibres obtenues à partir de veines variqueuses par rapport à des fibres de collagène de veines normales de veau. Cette diminution importante du diamètre des fibres pourrait simplement résulter d'une plus faible concentration des solutions initiales. Elle pourrait aussi être due à la présence d'un autre contaminant protéique qui interférerait dans la fibrillogenèse. Il a été démontré, par exemple, que la présence d'une molécule de glycoprotéine de tendon de boeuf avait deux effets sur la fibrillogenèse : elle retarde l'assemblage des molécules de collagène entre elles et elle diminue le diamètre final des fibres obtenues. De telles interactions pourraient avoir lieu dans notre cas entre le collagène extrait et la protéine ou peptides contaminants, ce qui expliquerait le faible diamètre des fibres observées.

Des essais de formation de segments SLS ont été faits en présence d'ATP, mais ils ont été inefficaces. D'après Doyle (15), la formation des SLS polaires doit être due à une affinité entre acides aminés homologues sur les hélices parallèles. Une telle affinité peut être de deux sortes : ou résulter d'une interaction hydrophobe directe entre chaînes latérales non-chargées, ou procéder de liaisons indirectes entre chaînes chargées, grâce à l'entremise de quelque molécule non-collagénique. Puisque l'ATP ou toute autre molécule chargée négativement est requise pour ces structures, on peut penser qu'elle est utilisée pour établir une liaison entre chaînes latérales adjacentes ayant une charge positive nette. La présence d'une autre molécule contaminante, protéine ou peptide, pourrait empêcher ce type d'interactions, surtout si le contaminant a une affinité pour le collagène plus grande que celle de l'ATP.

### 3. Conclusions.

Il est difficile de tirer des conclusions en ce qui concerne les différences observées lors de l'extraction des collagènes de veines normales de veau et de veines humaines variqueuses. Il est évident que la solubilité du collagène des veines variqueuses est nettement diminuée par rapport à celle des veines saphènes de veau. Mais, il n'est pas possible de dire si cette différence provient d'une différence entre espèces zoologiques, ou, si elle est vraiment significative dans le syndrome variqueux. Il a été démontré qu'en règle générale, chez les

individus jeunes le collagène est plus soluble que chez les individus âgés. Une des caractéristiques du vieillissement se manifeste ainsi par une insolubilité accrue du collagène. Pour vérifier si la solubilité du collagène est réellement affectée dans la maladie variqueuse, il faudrait analyser en parallèle des veines saines humaines d'individus de même âge. Il est évident que dans une première étude du collagène de veines, ce cas n'a pas pu être étudié. Le problème de l'étude des veines variqueuses n'a débuté qu'à la fin de notre travail de thèse et il demande à être poursuivi.

Une autre constatation faite lors de l'extraction, est l'obtention en grande quantité d'un matériel non-collagénique, soluble dans l'acide acétique, et qui n'apparaît pas lors de l'extraction de veines de veau. Des différences dans les autres constituants de la paroi veineuse, protéoglycans ou élastine par exemple, ont déjà été notées par Svejcar (74, 75), en ce qui concerne leurs proportions relatives. Des anomalies dans le comportement des autres constituants de la paroi veineuse ou dans les interactions entre protéoglycans et collagène doivent aussi être prises en considération.

D'autre part ce matériel solubilisé par des méthodes non-dégradantes ne représente qu'une faible proportion du collagène total de la veine variqueuse. L'utilisation de la pepsine se révèle donc nécessaire.

## B. COLLAGENE SOLUBILISE A L'AIDE DE LA PEPSINE.

### 2. Précipitation fractionnée du collagène de veines variqueuses extrait par la pepsine.

#### 2.1. Matériel et méthodes .

Toutes les méthodes utilisées sont les mêmes que pour l'analyse de l'extrait pepsique de veines de veau et ont déjà été décrites.

#### 2.2. Résultats et discussion.

##### 2.2.1. Rendement de la précipitation fractionnée.

Des différences assez importantes entre le comportement des collagènes de veines de veau et de veines variqueuses ont été observées. Ainsi , en précipitation fractionnée , le collagène solubilisé par la pepsine doit d'abord être mis en solution dans un tampon phosphate de potassium 0.16 M pH 7.6 . Or , dans le cas du collagène de veines variqueuses , une grande partie reste insoluble dans ces mêmes conditions (plus de la moitié du collagène extrait par la pepsine. ). Il faut noter aussi que la pepsine s'est révélée moins efficace dans la solubilisation du résidu tissulaire. Dans le cas des veines de veau , le 90 % du collagène restant dans le résidu tissulaire a passé en solution lors de l'extraction pepsique , alors que pour les veines humaines variqueuses, le 60 à 70 % seulement du collagène restant dans le résidu a pu être solubilisé .

Une précipitation fractionnée du collagène de veines variqueuses passant en solution dans le tampon phosphate pH 7.6 a donné les rendements suivants :

|                                                                |           |
|----------------------------------------------------------------|-----------|
| Poids du collagène introduit dans le tampon phosphate de K     | : 800 mg  |
| Quantité de collagène restant insoluble dans ce tampon         | : 550 mg  |
| Collagène précipité à 1.5 M en NaCl                            | : 100 mg  |
| Collagène précipité à des concentrations plus grandes en Na Cl | : 15.5 mg |

On constate que le 68 % du collagène de veines variqueuses extrait à la pepsine demeure insoluble dans un tampon à pH neutre. Le collagène restant en solution après la précipitation à 1.5 M étant très peu abondant une seule précipitation a été effectuée subséquemment, à 3.4 M en lieu et place des deux précipitations

effectuées sur le collagène de veines normales , à 2.4 et 3.4 M.

### 2.2.2. Analyse des acides aminés .

La composition en acides aminés des différentes fractions est indiquée à la table 6 . D'après ces données , on ne peut pas tirer de conclusions quant aux types de collagène présents. Ces compositions en acides aminés ne sont d'ailleurs pas à considérer comme des valeurs exactes , les analyses faites étant trop peu nombreuses . Mais les proportions relatives de certains acides aminés dans les différentes fractions peuvent être des indices de l'enrichissement d'une fraction en un type donné. On constate ainsi que , par rapport à la composition en acides aminés du collagène total extrait par la pepsine , les fractions de collagène restées insolubles et celles précipitées à 1.5 M marquent une nette augmentation du contenu en Hyp jointe à une diminution du contenu en Ala et Val et à une augmentation de Gly. Ces variations vont donc toutes dans le sens d'un enrichissement en type III. La fraction de protéines restées en solution après la précipitation à 1.5 M renferme certainement aussi du type I mais présente des analogies avec la fraction précipitée à 3.4 M dans les veines normales , c.à.d. un contenu réduit en Gly , Hyp , et Arg et un contenu élevé en Ala , Val , Leu et Tyr.

### 2.2.3. Séparation sur gels de polyacrylamide 6% , en présence de SDS.

Les résultats de cette expérience sont rassemblés dans la figure 22. Dans le cas du collagène de veines de veau , on avait constaté , dans les mêmes conditions , un % nettement plus élevé de  $\gamma$  que pour le collagène extrait par l'acide acétique , simultanément à une diminution des  $\beta$  . Toutefois dans le collagène de veines variqueuses , on ne détecte pas de nettes divergences , comme si le type III n'était présent qu'en quantités réduites. Il n'y a pratiquement pas de différence entre le collagène total et celui non-redissous dans le tampon phosphate de K. On détecte la présence d'une chaîne migrant entre les positions des  $\alpha$  et des  $\beta$  , déjà dans le collagène non fractionné. Cette chaîne migre dans une position identique à l'une des deux chaînes détectées dans le précipité à 3.4 M et elle semble présente en quantités

plus grandes dans le collagène de veines variqueuses que dans le collagène de veines normales. La fraction précipitée à 1.5 M en NaCl semble contenir une grande proportion de type III, puisqu'une grande quantité de matériel migre dans la région de  $\alpha_1$ . Cette fraction présente aussi une haute teneur en peptides ou protéines migrant en amont de la chaîne  $\alpha_2$  et représente probablement des produits de l'hydrolyse par la pepsine. Par intégration des pics, ce matériel de faible poids moléculaire compte pour 17 % dans le bilan de la fraction précipitée à 1.5 M. Peut-être le collagène de veines variqueuses est-il moins résistant à la pepsine que le collagène de veines de veau ? Ou alors, l'extrait pepsique contient-il aussi des protéines d'origine non-collagéniques ? Cette deuxième hypothèse n'est pas très vraisemblable, les protéines non-collagéniques ne présentant pas une grande résistance à l'hydrolyse pepsique, et l'analyse des acides aminés de l'extrait pepsique ne révélant pas de contaminants protéiques en quantités importantes. Dans la fraction des protéines restant en solution après la précipitation à 1.5 M, on détecte à nouveau la présence des 2 chaînes déjà annoncées pour le précipité à 3.4 M des veines normales. En outre, il existe une faible proportion de collagène de type I. Pour caractériser mieux ce collagène de veines variqueuses, une électrophorèse interrompue, sur gel de polyacrylamide 6 % a été effectuée, dans les mêmes conditions que pour le collagène de veines de veau.

FIGURE 22

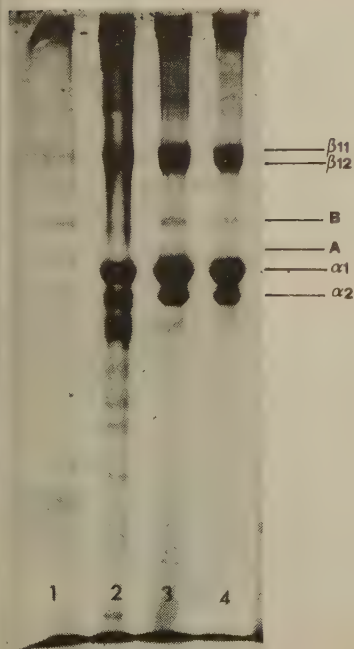


Figure 22.

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide 6 % des différentes fractions pepsiques de collagène de veines variqueuses.

- 1) Fraction précipitée à 3.4 M en NaCl.
- 2) Fraction précipitée à 1.5 M en NaCl.
- 3) Fraction non redissoute dans le tampon phosphate à pH 7.6
- 4) Extrait pepsique total.

TABLE 6

| Nom de l'acide aminé | v. variquies pepsine, total | v. normales pepsine, total | v. variquies, 1.5 M en NaCl. | v. normales 1.5 M en Na Cl | v. variquies, 3.4 M en Na Cl. | v. normales 3.4 M en NaCl. | v. variquies, insolubles dans le tampon phosphate de K. |
|----------------------|-----------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|-------------------------------|----------------------------|---------------------------------------------------------|
| 4 Hyp                | 82                          | 108                        | 113                          | 112                        | 30.7                          | 27                         | 124.5                                                   |
| Asx                  | 47.6                        | 45                         | 42.3                         | 44                         | 44.2                          | 20                         | 40.3                                                    |
| Thr                  | 22                          | 17                         | 16.2                         | 16                         | 29.7                          | 16                         | 15                                                      |
| Ser                  | 37                          | 35                         | 34.7                         | 36                         | 52.1                          | 35                         | 30.2                                                    |
| Glx                  | 74.6                        | 71                         | 70.6                         | 72                         | 71                            | 42                         | 65                                                      |
| Pro                  | 112                         | 115                        | 117                          | 113                        | 108                           | 114                        | 129                                                     |
| Gly                  | 300                         | 340                        | 334                          | 347                        | 230                           | 290                        | 323                                                     |
| Ala                  | 120                         | 111                        | 97.5                         | 102                        | 157.8                         | 198                        | 94.4                                                    |
| $\frac{1}{2}$ Cys    | 2                           | 3                          | traces                       | 3                          | 5                             | traces                     | traces                                                  |
| Val                  | 40                          | 23                         | 21.9                         | 17                         | 68.5                          | 116                        | 24.7                                                    |
| Met                  | 6.4                         | 6                          | 8.3                          | 6                          | 6.7                           | 2                          | 7.5                                                     |
| Ile                  | 19                          | 11                         | 14.2                         | 11                         | 28                            | 17                         | 11.3                                                    |
| Leu                  | 35.5                        | 24                         | 25.7                         | 22                         | 48                            | 37                         | 21.9                                                    |
| Tyr                  | 11                          | 4                          | 3.57                         | 3                          | 24.9                          | 14                         | ---                                                     |
| Phe                  | 16.7                        | 14                         | 13.2                         | 12                         | 28.1                          | 34                         | 14.6                                                    |
| HyI                  | 5.2                         | 6                          | 7                            | 6                          | 4.1                           | 2                          | 4.3                                                     |
| Ornithine ?          | ---                         | ---                        | ---                          | ---                        | 11.4                          | 12                         | ---                                                     |
| Lys                  | 22.9                        | 23                         | 28.7                         | 25                         | 21.6                          | 11                         | 36                                                      |
| His                  | 5.2                         | 5                          | 6.2                          | 6                          | 6.9                           | 5                          | 9.9                                                     |
| Arg                  | 41                          | 44                         | 45.8                         | 46                         | 22.7                          | 9.7                        | 48.3                                                    |

Table 6 : Composition en acides aminés des différentes fractions pepsiques extraites de veines variquies, comparées aux fractions pepsiques de veines saphènes normales de veau.

## 2.2. 4. Electrophorèse interrompue sur gel de polyacrylamide 6 %.

Une étude comparative de la migration électrophorétique des différentes fractions de collagène de veines variqueuses solubilisé par la pepsine , avec ou sans DTT , a été effectuée . Les résultats de cette expérience sont donnés à la figure 23.

FIGURE 23

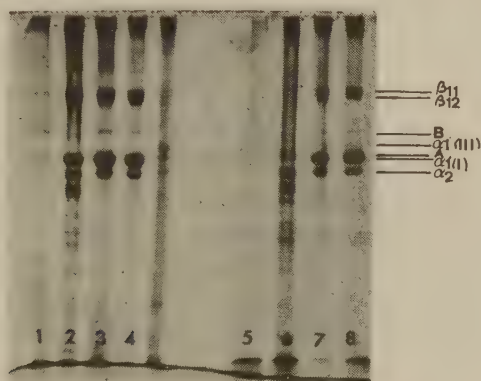


Figure 23 : Electrophorèse interrompue sur gel de polyacrylamide 6 % des différentes fractions pepsiques de veines variqueuses .

- 1) Fraction précipitée à 3.4 M sans DTT.
- 2) Fraction précipitée à 1.5 M en NaCl , sans DTT.
- 3) Fraction insoluble dans le tampon phosphate de K , pH 7.6, sans DTT.
- 4) Extrait pepsique total, sans DTT.
- 5) =1) , 6) = 2) , 7) = 3) , 8) = 4) , mais 5, 6, 7, 8, sont en présence de DTT.

On peut constater , qu'avec ou sans DTT , les migrations des différentes fractions restent presque inchangées . On n'a pas comme dans le cas du collagène de veines normales , une diminution des  $\gamma$  et une augmentation des  $\beta$  en présence de DTT. On constate cependant l'apparition d'un pic dans la région de  $\alpha_1(III)$ , lorsque DTT est présent , mais ce pic correspond à des quantités très faibles. Si on fait le même calcul que pour le collagène de veines normales :

$$\frac{\alpha_1(\text{III})}{\alpha_1(\text{III}) + \alpha_1(\text{I}) + \alpha_2} \times 100 = \% \text{ de collagène de type III} = 8 \%$$

Dans le cas du collagène de veines saphènes normales, on avait trouvé 29 %, calculé sur l'extrait pepsique total. Par la méthode au DTT, on trouve aussi dans la fraction insoluble dans le tampon phosphate de K, une chaîne migrant dans la région de  $\alpha_1(\text{III})$ . Il faut enfin noter le comportement assez étonnant de la fraction précipitée à 1.5 M en NaCl. Cette fraction mise sur un gel 6 % sans DTT, comportait, comme nous l'avons déjà mentionné des peptides de plus petit poids moléculaire que la chaîne  $\alpha_2$ . Ce matériel représentait environ le 17 % du total. En présence de DTT, on constate la disparition presque totale du matériel migrant dans la région des  $\beta$ , une diminution du pic migrant dans la région de  $\alpha_1$ , et une augmentation évidente du matériel de faible poids moléculaire. Il n'y a pas d'explication satisfaisante pour rendre compte de ce comportement. Il semble que l'on ait affaire à du matériel collagénique de type III, partiellement détruit par la pepsine. Seule une hydrolyse partielle du collagène peut expliquer une telle hétérogénéité. Dans le collagène de veines variqueuses humaines, la proportion de type III pourrait donc être plus importante que les 8 % calculés. Quant à la fraction précipitée à une concentration en sel de 3.4 M, elle ne contient pas de type III du tout, mais encore du type I. Elle contient les mêmes bandes avec ou sans DTT, et contient un matériel analogue à celui précipité à 3.4 M dans l'extrait pepsique de veines normales.

#### 2.2.5. Peptides CNBr des différentes fractions pepsiques provenant des veines variqueuses.

L'examen de ces peptides révèle la présence d'oligopeptides caractéristiques du type III, et ceci en quantités beaucoup plus importantes que ne le faisait prévoir l'expérience du gel interrompu. Les résultats sont illustrés à la figure 24. Comment expliquer les divergences entre ces deux expériences ? Deux hypothèses sont possibles. Ou bien le procédé du gel interrompu fournit un meilleur reflet de la réalité et dans ce cas, les peptides migrant là où se situent habituellement les peptides du type III, proviendraient d'autres contaminants protéiques, ou encore de peptides altérés, originellement de type I. Ou alors, et ceci est plus probable, ce sont les résultats obtenus

avec les peptides CNBr qui sont exacts et, dans ce cas, l'expérience de gel interrompu n'offre pas une image correcte de la réalité. Une des explications plausibles serait que le type III contenu dans les veines variqueuses ait une résistance moindre à la pepsine que le type I. Cette hypothèse est assez en accord avec le comportement noté pour la fraction précipitant à 1.5 M à partir de l'extrait pepsique de veines variqueuses. Cette fraction comporte effectivement une série de petits fragments, compatibles avec des coupures protéolytiques. Cependant, le diagramme des peptides CNBr de cette fraction est en tout point semblable à celui de la fraction non soluble dans le tampon neutre. On peut penser que la fraction précipitée à 1.5 M en NaCl soit constituée par un collagène en partie hydrolysé, avec chaînes raccourcies, et que les fragments issus de ces chaînes après clivage au CNBr sont trop petits pour être détectés sur notre système de gel- gradient.

Quant à la fraction restant en solution après la précipitation à 1.5 M, elle est tout à fait comparable à celle précipitée à 3.4 M à partir de veines normales. Elle contient, en effet, des peptides dérivés du type I et des peptides de faible poids moléculaire n'ayant pas d'analogie avec ceux dérivés soit du type I, soit du type III. Ces peptides ressemblent à ceux dérivés de la chaîne  $\alpha B$  de Burgeson (6). Mais des réserves sont à faire à ce sujet, jusqu'à ce que la caractérisation définitive de ces composants soit accomplie.

FIGURE 24

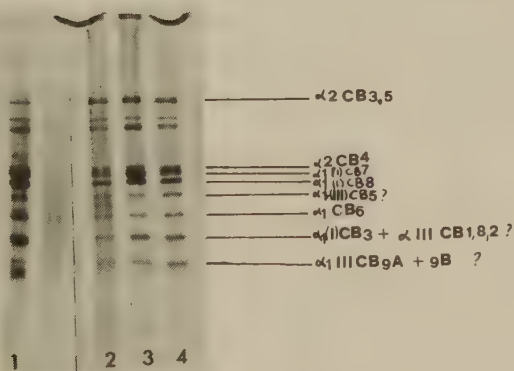


Figure 24 : Electrophorèse sur gel-gradient d'acrylamide 10 à 18 % des peptides de CNBr issus de différentes fractions de collagène extrait par la pepsine, à partir des veines variqueuses.

- 1) Extrait pepsique total de veines de veau.
- 2) Extrait pepsique total de veines variqueuses.
- 3) Fraction pepsique insoluble dans le tampon phosphate de K, pH 7.6
- 4) Fraction pepsique de v. variqueuses, précipitée à 1.5 M.

### 2.3. Conclusions .

En ce qui concerne les veines variqueuses, le travail effectué ici est trop restreint pour autoriser des conclusions définitives. D'autre part, comme nous l'avons déjà mentionné, il faudrait, pour une comparaison valable, travailler en parallèle sur des veines saines humaines.

Les données acquises, par rapport au collagène de veines de veau, puisque nous ne pouvons pas prendre un collagène de veines humaines pour référence, sont les suivantes :

le collagène de veines variqueuses humaines, s'est révélé beaucoup moins soluble, quelle que soit la méthode utilisée pour l'extraction, citrate, acide acétique ou pepsine. Il est aussi plus difficile de l'isoler sous une forme pure, à cause de la présence d'une ou de plusieurs protéines contaminantes, solubles dans l'acide acétique. Il faut relever que ces contaminants sont absents à l'extraction du collagène de veines de veau. La proportion des types moléculaires semble aussi être différente, le type II<sub>1</sub> étant en quantités moindres dans les veines variqueuses. Ce dernier point n'est pas absolument décisif, les résultats obtenus par l'expérience de gel interrompu et par celle des peptides CNBr n'étant pas concordants. Une autre hypothèse plausible serait une moindre résistance du collagène de type III issu de veines variqueuses à l'action de la pepsine. Des investigations sur la solubilité du collagène extrait de veines variqueuses, et sur la nature des protéines contaminantes, ainsi que des précisions quant aux types de collagène présents, sont encore à faire. D'autre part, le domaine se rapportant aux unités saccharidiques attachées à ce collagène n'a pas été étudié et, c'est un point majeur pour l'interprétation des altérations physiologiques variqueuses.

## CONCLUSIONS GENERALES.

Au cours de ce travail , nous avons isolé et purifié une partie du collagène de type I de veines saphènes de veau . Sur ce collagène , des investigations ont été conduites sur la composition en acides aminés , la séparation des chaînes , la caractérisation des peptides au CNBr . Elles ont prouvé aussi bien l'intégrité de la molécule après isolement et purification , que son appartenance au type I. Il faut relever , par ailleurs , que le 16 % du collagène de veines de veau a pu être obtenu sous forme soluble , purifiée intacte et native , sans l'utilisation de la pepsine ou d'autres procédés hydrolysants. Ce pourcentage particulièrement élevé de collagène soluble extrait est dû , au moins en partie , à notre nouvelle méthode de solubilisation.

Les études menées en parallèle par L. Vadas ( 83 ) ont prouvé l'existence dans ce collagène d'unités saccharidiques en quantités plus grandes que celles ordinairement détectées sur un collagène normal de type I , et la présence d'un hydrate de carbone inconnu dans le collagène de vertébrés , le xylose. Des travaux en cours ont pour but de localiser exactement ce xylose sur la molécule de collagène.

La deuxième partie de ce travail a porté sur le dosage comparatif des divers types de collagène présents dans la paroi veineuse , ce qui a nécessité l'emploi de la pepsine, pour solubiliser au maximum le collagène vasculaire non dissous dans les acides organiques. Cette extraction pepsique présente l'inconvénient de ne pas laisser la molécule de collagène intacte. Nous l'avons adoptée tout de même , parce que c'est la seule méthode valable jusqu'à ce jour pour obtenir du type III soluble , en quantités appréciables. Nous avons ainsi mis en évidence la présence du type III dans la paroi veineuse. En plus des types I et III , il faut noter en outre la présence dans notre extrait pepsique de deux nouvelles chaînes , dont la caractérisation demeure encore incomplète ; mais , beaucoup d'indices permettent de les assimiler aux chaînes A et B découvertes récemment par Burgeson ( 6 ) , et dont Rhodes et Miller ont fait deux nouveaux types de collagène dans la classification conventionnelle ( 64 ).

D'autre part , une étude préliminaire du collagène de veines variqueuses a été entamée , limitée jusqu'ici par les difficultés d'accumuler ce matériel biologique.

Toutes les données obtenues nous ont permis de fournir une description du collagène de veines , notamment de la proportion des différents types génétiques. Ces études sont loin d'être achevées et de nombreuses voies de recherche sont encore à explorer , particulièrement en ce qui concerne les hydrates de carbone et leurs fonctions naturelles dans la paroi veineuse.

Il serait en effet , intéressant de localiser plus précisément le site d'attachement du xylose , puisque cette unité saccharidique est nouvelle dans le collagène de vertébrés. L'implication des unités saccharidiques dans certains phénomènes biologiques liés au collagène , tels que l'agrégation plaquettaire , par exemple , n'est pas encore entièrement connue. Les relations entre les collagènes et les fibronectines , les modes de liaison collagènes-protéoglycans , les interactions entre les différents types génétiques , et le rôle biologique des deux nouvelles chaînes de collagène découvertes récemment dans de nombreux tissus , sont autant de domaines à explorer.

Une meilleure connaissance du collagène de veine doit ouvrir une nouvelle approche dans les recherches concernant la pathologie variqueuse. Toutes les techniques nécessaires à une telle étude étant maintenant au point sur la veine saine de veau , une comparaison entre veines humaines normales et variqueuses sera donc facilement exécutée . Plusieurs points concernant le collagène de veines variqueuses devront être éclaircis . Tout d'abord , pour avoir des précisions sur les propriétés de solubilité , une étude des cross-links doit être envisagée . D'autre part , il est connu qu'à la base de certaines maladies du tissu conjonctif , des altérations dans les proportions des différents types moléculaires de collagène jouent un rôle important. Il semble bien , d'après nos résultats , que des différences dans ce domaine existent entre veines normales de veau et veines variqueuses humaines. Il serait donc intéressant de savoir si ces différences se manifestent aussi lorsque la comparaison est faite avec du collagène de veines normales humaines , pour autant qu'une source de matériel biologique soit accessible , ce qui n'a pas été le cas jusqu'ici. Enfin , d'après nos résultats , il semble que l'une des deux nouvelles chaînes , la chaîne B soit présente en plus grande quantité dans la veine variqueuse que dans la veine normale.

Toutes nos données concernant le collagène de veine , aussi bien du point de vue de sa structure que de celui de la proportion des types en présence , ouvrent donc la voie à toute une série d'études non dépourvues d'intérêt.

# BIBLIOGRAPHIE

1. ANDERSON J.C. , LABEDZ , R.I. , KEWLEY , M.A. (1977)  
Biochem. J. 168 , 345-351.
2. BAILEY , A.J. , SIMS , T.J. (1976)  
Biochem. J. 153 , 211 - 215.
3. BORNSTEIN , P. , PIEZ , K.A. (1966)  
Biochemistry 5 , 3460
4. BORNSTEIN ,P. (1968)  
Science 161 , 592
5. BROWN , R.A. ,SHUTTLEWORTH ,C.A. , WEISS , J.B. (1978)  
Biochem. Biophys. Res. Comm. 80 ,1298 - 1306.
6. BURGESON , R.E. , EL ADLI , F.A. , KAITILA ,I.I., HOLLISTER ,D.W. (1976 )  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73 , 2579 - 2583.
7. CHANDRARAJAN , J. (1978)  
Biochem. Biophys. Res. Comm. 83 , 180 - 186.
8. CHUNG , E. , MILLER , E.J. (1974)  
Science 183 , 1200 - 1201.
9. CHUNG , E. KEELE , E.M. , MILLER , E.J. ( 1974)  
Biochemistry 13 , 3459- 3464.
- 10.CHUNG , E. RHODES, R.K. , MILLER , E.J. (1976 )  
Biochem. Biophys. Res. Comm. 71 ,1167 - 1174.
- 11.COLLINS , D. , LINDBERG , K. , Mc LEES , B. , PINNELL , S. (1977)  
Biochem. Biophys. Acta 495 , 129 - 139 .
- 12.DANIELS ,J.R. , CHU , G.H. (1975 )  
J. Biol. Chem. 250 , 3531 - 3537.

13. DI FERRANTE , N. , LEACHMAN,R.D. , ANGELINI ,P., DONNELLY ,P.V., FRANCIS , G.,  
ALMAZON, A.(1975)  
Connect. Tissue Res. 3 , 49 - 54.
14. DOOLITTLE , R.F. , ARMENTROUT, R.W. (1968)  
Biochemistry 7 , 516- 521.
15. DOYLE ,B.B. HUKINS , W.L., HULMES , D.J.S., MILLER ,A. , WOODHEAD-GALLOWAY, J.  
(1975 )  
J.Mol.Biol. 91 , 79 - 99 .
16. DRAKE ; M.P. , DAVISON ,P.F., BUMP, S., SCHMITT,F.O.(1966)  
Biochemistry 5 , 301 - 312.
17. EBEL ,A. (1969)  
Angiologica 6 , 114
18. EPSTEIN, E.H. , SCOTT, R.D. , MILLER , E.J. , PIEZ , K.A. (1971)  
J. Biol. Chem. 246 , 1718 - 1724.
19. EPSTEIN, E. H. (1971)  
Clin. Res. 19 , 359
20. EPSTEIN, E.H.(1974)  
J.Biol. Chem. 249 , 3225 - 3231.
21. EPSTEIN ,E.H. , MUNDERLOH, N.H. (1975)  
J.Biol.Chem. 250 , 9304 - 9312.
22. EYRE, D.R. , GLIMCHER, M.J. (1973)  
Biochem. J. 135 , 393 - 403.
23. FUJII ,K., TANZER, M.L. , NUSGENS ,B.V. , LAPIERE , C,M. (1976)  
Biochem. Biophys. Res. Comm. 69 , 128 - 134 .
24. FURTHMAYR, H. TIMPL, R. ( 1971)  
Anal. Biochem. 41 , 510- 516.

25. GRANT, J.E. , JACKSON, D.S. (1976)  
in Essays en Biochemistry 12 , p. 99 et 102.  
Edité par Campbell P.N. , et Aldridge W.N. Published for biochemical society  
by Academic Press.
26. GRAY ,W.R. , HARTLEY,B.S. (1963)  
Biochem. J. 89 , 59P et 89 , 379
27. GRAY ,W.R. (1972)  
dans : Colowick ,S.P. et Kaplan , N.O. : Methods in Enzymology , vol. 25 B  
P. 121 - 138 (Academic Press , New York and London )
28. GURTHUR , L.G. (1973)  
J. of Chromato. 76 , 225
29. HARRIS , E.D. , KRANE , S.M. (1974)  
N.Eng.J.Med. 291 , 557 - 563 , 605 - 609 , 652 - 661 .
30. HENKEL,W. (1975)  
Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 356 , 567
31. HIRS, C.H.W. , MOORE,S. , STEIN,W.H. (1956)  
J. Biol. Chem. 219 , 623
32. HODGE ,A.J. HIGHBERGER , J.H., DEFFNER,G.G.H. , SCHMITT, F.O. (1960)  
Proc.Nat. Acad. Sci. USA , 46 , 197 - 206.
33. HUXLEY , H.E. , ZUBAY,G. (1960)  
J.Mol. Biol. 2 , 10 et 2 , 189
34. IWATSUKI ,K. ,CARDINALE, G.J. , SPECTOR, S. , UDENFRIEND,S.(1977)  
Science 198 , 403 - 404 .
35. BARGETZI , J.P. , JAMPEN ,M. (1972 )  
Angiologica 9 , 257 (125 )
36. JIMENEZ , S.A. , YANKOWSKI ,R. , BASHEY. R.I. (1978)  
Biochem. Biophys. Res. Comm. 81 , 1298 - 1306.
37. JIMENEZ , S.A. , BASHEY, R.I. , BENDITT, M., YANKOWSKI , R. (1977)  
Biochem. Biophys. Res. Comm. 78 , 1354 - 1361.

38. JUNQUEIRA , J. CARNEIRO.,J. , CONTOPOULOS , A.  
in Basic Histology . Original title : Histologia basica , 2<sup>nd</sup> ed. 1971 by Editôrd  
Guanabara Koopen S,A. Rio de Janeiro , Brazil  
Copyright 1975 by Lange Medical Publications.
39. KANG ,A.H. PIEZ ,K.A. , GROSS, J. (1969)  
Biochemistry 8 , 1506 - 1514.
40. KEFALIDES ,N.A. (1971)  
Biochem. Biophys. Res. Comm. 45 , 226 - 234 .
41. KUHN , K. (1969)  
Essays in Biochemistry 5 , 59 - 87 . (p. 62)
42. LAEMMLI ,U.K. (1970)  
Nature , 227 , 680 - 685.
- 43, LAPIERE , C.M. , PIERARD , G. (1974)  
J. invest. Dermatology 62 , 582
44. LAYMAN, D.L. Mc GOODWIN , E,B. , MAR( IN,G.R. (1971)  
Proc. Nat.Acad.Sci. USA , 68 , 454.
45. LICHTENSTEIN, J.R. , MARTIN, G.R. , KOHN, L.D. , BYERS, P.H. , Mc KUSICK,V.A.(1973)  
Science 182 , 298 - 300.
46. MANNSCHOTT,P.HERBAGE, D. WEISS,M.BUFFEVANT , C. (1976)  
Biochem. Biophys. Acta 434 , 177 - 183.
47. MAYNE, R. ;VAIL, M.S. , MILLER, E.J.(1978)  
Biochemistry 17 , 446 - 452.
48. Mc CLAIN,P.E. (1974)  
J.Biol. Chem. 249 , 2303 - 2311.
49. MILLER ,E.J., MATUKAS, U.J. (1969)  
Proc. Nat. Acad.Sci. USA 64 , 1264 - 1268.
50. MILLER, E.J. (1971)  
Biochemistry 10, 1652 - 1658.

51. MILLER , E.J. (1971)  
Biochemistry 10 , 3030 - 3035
52. MILLER,E.J. , EPSTEIN , E.H. , PIEZ ,K.A. (1971)  
Biochem. Biophys. Res. Comm. 42 , 1024 - 1029.
53. MOORE ,S. , STEIN, W.H. (1963)  
dans Methods in Enzymology 6 ( Colowick,S., Kaplan ,N.O. , édité par Acad.  
Press , N.Y. ) p. 819 - 831.
54. MORO , L. , SMITH , D. (1977)  
Arch. Biochem. Biophys. 182 , 33-41.
55. NIMNI ,M., DESMUKH ,K. (1973)  
Science 181 , 751 - 752.
56. PENTINEN , R.P. , LICHTENSTEIN,J.R. , MARTIN,G.R. , Mc KUSICK ,U.A.( 1975)  
Proc. Nat. Acad.Sci. USA 72 , 586 - 589.
57. PINNELL,S.R. , KRANE,S.M. , KENZORA,J.E. , GLIMCHER , M.J.(1972)  
N.Eng.J.Med. 286 , 1013 - 1020.
58. POPE, M.F. , MARTIN,G.R., LICHTENSTEIN, J.R., PENTINEN ,R. , GERSON, B. ,  
ROWE , D.W., Mc KUSICK, U.A. (1975)  
Proc. Nat.Acad. Sci. USA 72 , 1314 -1316.
59. RAMACHANDRAN, G.N. (1963)  
Int. Rev. Connect. Tissue Res. 1 , 127
60. RAO, N.V. , ADAMS, E. (1975)  
Anal. Biochem. 68 , 209 - 217.
61. RAUTERBERG, J. , KUHN, K. (1971 )  
Eur.J. Biochem. 19 , 398 - 407.
62. RAUTERBERG,J.,von BASSEWITZ ,D.B. (1975)  
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 356 , 95 - 100.
63. REINDEL, F. HOPPE ,W. (1954)  
Chem. Ber. 87 , 1103

64. RHODES ,R.K., MILLER , E.J. (1978)  
Biochemistry 17 , 3442 - 3448.
65. RICH, A.,CRICK, F.H. (1961)  
J.Mol. Biol. 3 , 483 - 506.
66. RICKENBACHER, J. (1971)  
in : Rüttner, J.R. , et Leu , H.J. , : "Die Venenwand " , p. 9-17, (Huber Verlag, Bern.)
67. ROE ,J.H. (1954)  
J.Biol.Chem. 212 , 335 - 343.
68. SATO, T., SPIRO , R.G. (1976)  
J.Biol.Chem. 251 , 4062 - 4070.
69. SCHNEIR, M., MILLER, E.J.( 1976)  
Biochem.Biophys.Acta 446 , 240 - 244.
70. SEIFTER,S., GALLOP, P.M. (1966)  
The proteins , H.Neurath , ( Acad.Press 2<sup>eme</sup> edition ) 4
71. SPIRO,R.G. (1969)  
J.Biol.Chem. 244 , 602 - 612.
72. STARK , M., KUHN,K. (1968)  
Eur; J. Biochem. 6 , 534
73. STEGEMANN,H. (1958)  
Hoppe Seyler's Z. Physiol.Chem. 311 , 41
74. SVEJCAR ,J., PREROVSKY, I., LINHART, J., KRUMML, J. (1962)  
Circulat..Res. 11 , 296 - 300.
75. SVEJCAR,J. , PREROVSKY,I., LINHART,J., KRUMML,J., BECKOVA, B. (1963)  
Clin. Sci. 24 , 325 - 330.
76. SYKES,B.C. (1976)  
FEBS Letters 61 , 180 - 185.

77. SYKES, B.C. , PUDDLE, B., FRANCIS, N. , SMITH, R. (1976)  
Biochem. Biophys. Res. Comm. 72 , 1472 - 1480.
78. TRELSTAD, R.L. , KANG, A.H., IGARASHI, S. , GROSS, J. (1970)  
Biochemistry 9 , 4993 - 4998.
79. TRELSTAD, R.L. , (1974)  
Biochem. Biophys. Res. Comm. 57 , 717 - 725.
80. TRELSTAD, R.L., CATANESE, V.M., RUBIN, D.F. (1976)  
Anal. Biochem. 71 , 114 - 118.
81. UIITO , J. (1971)  
Ann. Clin. Res. 3 , 250 - 258.
82. UIITO, J., LICHTENSTEIN, J.R. (1976)  
J. of Investigative Dermatology 66 , 59 - 79.
83. VADAS, L. (1979)  
Thèse de doctorat , Genève.

